

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



BI

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 38/24 // (A61K 38/24, 38:09)		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/16459 (43) Date de publication internationale: 22 juin 1995 (22.06.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/01464 (22) Date de dépôt international: 14 décembre 1994 (14.12.94) (30) Données relatives à la priorité: 93/15171 16 décembre 1993 (16.12.93) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE MERIEUX [FR/FR]; 17, rue Bourgelat, F-69002 Lyon (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DUFOUR, Raymond [FR/FR]; 97, rue Garibaldi, F-69006 Lyon (FR). TEICHNER, Marc, Maurice [FR/FR]; 3, rue J.-B.-Simon, F-69110 Sainte-Foy-les-Lyon (FR). CHOUVET, Claire [FR/FR]; 68, cours Gambetta, F-69007 Lyon (FR). (74) Mandataires: BERNASCONI, Jean etc.; Cabinet Bernasconi et Vigier, 13, boulevard des Batignolles, F-75008 Paris (FR).			(81) Etats désignés: AT, AU, BR, CA, CH, DE, DK, ES, GB, NL, NZ, PT, RU, SE, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée Avec rapport de recherche internationale.
(54) Title: CONTROLLED SUPEROVULATION METHOD FOR FEMALE CATTLE UNDERGOING PROLONGED ANOESTRUS, ANOESTRUATION METHOD AND SUPEROVULATION KIT (54) Titre: METHODE DE SUPEROVULATION DIRIGEE DES FEMELLES BOVINES MISES EN ANOESTRUS PROLONGE, METHODE DE MISE EN ANOESTRUS ET KIT DE SUPEROVULATION (57) Abstract A controlled superovulation method for female cattle, wherein an LHRH analogue is administered to the animal to desensitise the pituitary gland to endogenous LHRH activity, and a follicle stimulating hormone (FSH) is administered to the animal at a selected time within the resulting period of deep anoestrus to induce the recruitment and development of ovarian follicles, whereafter a hormone selected from the group consisting of LH and hCG is administered to the animal to trigger follicle ovulation. The method may be implemented using kits containing hormone preparations. (57) Abrégé Méthode de superovulation dirigée des femelles bovines, comprenant les étapes suivantes: administrer à l'animal un analogue de la LHRH de manière à désensibiliser l'hypophyse à l'action de la LHRH endogène, à l'instant de son choix à l'intérieur de la période d'anoestrus profond ainsi induite, administrer à l'animal de l'hormone FSH de manière à induire le recrutement et le développement des follicules ovulatoires, en fin de développement, administrer à l'animal une hormone choisie parmi le groupe consistant en LH et hCG, de manière à déclencher l'ovulation de ces follicules. La méthode peut être mise en œuvre avec des kits contenant les préparations d'hormones.			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Biélorus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovenie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

Méthode de superovulation dirigée des femelles bovines mises en anoestrus prolongé, méthode de mise en anoestrus et kit de superovulation.

5 La présente invention a trait à une méthode de superovulation dirigée des femelles bovines après mise en anoestrus et aussi, en particulier, à la méthode spécifique de mise en anoestrus de ces animaux. Elle concerne aussi un kit de superovulation pour femelles bovines.

10 La variabilité dans le nombre d'ovocytes obtenus après le traitement de superovulation couramment appliqué et reposant sur l'emploi combiné, d'une part de l'hormone gonadotrope FSH (Follicle Stimulating Hormone) en présence de plus ou moins de LH (Luteinizing Hormone) et, d'autre
15 part, d'un médicament lutéolytique, limite le développement de la technique de production d'embryons de bovins par la femelle superovulée.

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Bien que l'importance du moment de l'application du traitement sur les résultats de la superovulation ait été décrite très antérieurement (D. Monniaux et al., Theriogenology, 1983, 19, 55-81), ce sont les travaux récents sur les propriétés respectives des follicules apparaissant au cours de l'intervalle interovulatoire et les modifications concomitantes de la FSH plasmatique qui ont mis en lumière le rôle de certains mécanismes de régulation de la croissance des follicules antraux.

10 Chez les bovins, l'observation des follicules par les méthodes d'échographie a montré que la croissance folliculaire intervient sous forme de vagues au nombre de 2 ou 3 (Travaux de J. Ireland et J.F. Roche, 1983 cités par J.F. Roche et al., Theriogenology, 1991, 3 (1), 81-89) dans
15 l'intervalle interovulatoire normal.

Chacune d'elles est constituée par le recrutement simultané de plusieurs follicules antraux de petit diamètre qui sont décelés dès que leur diamètre est voisin de 4 mm. Leur croissance laisse apparaître rapidement un follicule
20 dominant, plus grand que les autres, qui peut être ovulatoire (follicule dominant de la 2e ou de la 3e vague dans les cycles à 2 ou 3 vagues respectivement) ou anovulatoire (follicule dominant de la 1e ou de la 2e vague dans les cycles à 2 ou 3 vagues respectivement). Les autres
25 follicules, ou follicules surbordonnés, se différencient du précédent par l'arrêt de leur croissance, qui est suivie de leur régression. L'action inhibitrice du follicule dominant présent sur la réponse de superovulation au traitement par la FSH a été bien mise en évidence (L.A. Guilbaut et al., J.
30 Reprod. Fert., 1991, 91, 81-89). Ces auteurs ont en effet montré qu'en l'absence de follicule dominant, le taux d'ovulation est plus élevé et moins variable qu'en sa présence. Cependant, ils observent qu'en présence du follicule dominant deux classes de réponse ovulatoire peuvent être décrites qu'ils qualifient de réponse de

superovulation élevée ou basse. Cette expérimentation montre l'intérêt d'appliquer le traitement de superovulation au moment du cycle oestrien ne présentant pas de follicule dominant et conduit à mettre en oeuvre systématiquement un
5 examen échographique quotidien avant de déterminer le moment le plus propice à l'application du traitement par la FSH.

Une étude reposant sur les variations de la concentration plasmatique de FSH entourant la sélection du follicule dominant a permis de comparer les réponses de
10 superovulation obtenues après l'application du traitement avant ou immédiatement après la sélection du follicule dominant (G.P. Adams et al., Anim. Reprod. Sci, 1993, 30, 259-271). Les auteurs ont montré dans leurs deux essais effectués sur la première vague de follicules l'importance
15 de l'apport de FSH au moment de l'émergence du follicule dominant sur le maintien de la croissance des follicules subordonnés et leur transformation en follicules ovulatoires. L'accroissement de la taille des follicules subordonnés jusqu'au stade ovulatoire sous l'effet du
20 traitement de superovulation par la FSH a entraîné une moindre croissance du follicule dominant. Les auteurs n'ont pas observé l'émergence d'une nouvelle vague sous l'action du traitement, même s'il intervient après la phase de sélection (jour 5) où la concentration plasmatique de FSH
25 est à son niveau le plus bas. Cet état réfractaire serait rapporté à l'action suppressive directe, des autres follicules, bien qu'il n'en existe aucune démonstration expérimentale. Cet état réfractaire à l'apparition d'une nouvelle vague fut également observé en présence du
30 follicule dominant actif de la vague précédente (O.J. Ginther et al., J. Reprod. Fert., 1989, 87, 223-230).

Les connaissances acquises ces dernières années, illustrées par les travaux précités, montrent que l'efficacité du traitement de superovulation est augmentée si celui-ci intervient dès l'émergence du follicule dominant

et pendant la durée de la phase dite de compétition au cours de laquelle les follicules subordonnés peuvent se développer si une quantité appropriée de FSH leur est fournie. Cette efficacité serait également augmentée en l'absence de
5 follicules d'une vague antérieure pour éviter tout effet supprimeur de leur part. Les conditions physiologiques pouvant le mieux répondre à cette double exigence se rencontrent immédiatement après l'oestrus, état ovarien qui est caractérisé par la disparition du follicule dominant,
10 l'absence concomitante de follicules en régression et le début de la croissance des follicules de la 1ère vague. Cependant les traitements de superovulation effectués sur la 1ère vague de follicules ne permettent d'obtenir qu'un nombre d'ovulations inférieur à celui qui est obtenu par
15 l'application du traitement sur les autres vagues. La comparaison des résultats obtenus sur la 1ère vague (G.P. Adams et al., Anim. Reprod. Sci., 1993, 30, 259-71) sont nettement inférieurs à ceux qui furent obtenus en intervenant sur la 2ème vague (L.A. Guilbaut et al., J.
20 Reprod. Fert., 1991, 91, 81-89) entre les jours 7 et 12 du cycle. Elle montre que l'application du traitement de superovulation sur la 1ère vague ne peut apporter aucun avantage dans la pratique courante bien que le développement folliculaire de la 1ère vague soit un modèle d'étude
25 physiologique privilégié.

L'analyse descriptive de l'évolution des follicules ovariens a fait simultanément l'objet d'études sur les mécanismes indirects faisant intervenir les variations de la FSH plasmatique sur la croissance des follicules, la
30 sélection du follicule dominant et la régression des follicules subordonnés (G.P. Adams et al., J. Reprod. Fert., 1992, 94, 179-188). Les auteurs ont étudié d'une part l'effet de la suppression du follicule dominant sur le devenir des follicules subordonnés et l'apparition d'une nouvelle vague de follicules. Ils ont étudié d'autre part

l'action inhibitrice de l'injection de liquide folliculaire qui entraîne l'abaissement ou la suppression de la sécrétion de FSH, action due essentiellement à l'inhibine, sur le retard apporté à l'apparition d'une nouvelle vague de follicules ou sur des follicules en croissance d'une nouvelle vague. Des essais avaient permis à cette équipe (J.P. Kastelic et al., Theriogenology, 1990, 34, 499-509) de proposer qu'une nouvelle vague de follicules n'est pas à l'origine de l'atrésie du follicule dominant et des follicules subordonnés de la vague précédente. Dans leur étude (Adams, 1992), ils ont en effet observé que l'administration de liquide folliculaire, d'une part, entraînait l'arrêt de la croissance et la régression des follicules de la nouvelle vague, respectivement 1 et 5 jours après le début du traitement, et, d'autre part, entraînait la disparition de la FSH plasmatique sans accélérer l'involution des follicules de la vague précédente. Ces essais (Adams 1992 et Kastelic 1990-supra), ont permis également de montrer que l'abaissement de la sécrétion basale de FSH par ce traitement inhibait la croissance du follicule dominant. Pour les auteurs, cette observation renforcerait l'hypothèse que le follicule dominant reste dépendant d'une concentration basale de FSH, inférieure à celle qui est nécessaire aux autres follicules de la même cohorte.

Ces travaux (Adams, 1992 et 1993) ont montré qu'une décharge de FSH précède de 1 à 2 jours l'émergence d'une nouvelle vague de follicules, décelable par échographie, et qu'elle décline dès l'apparition de cette émergence. Cette diminution aboutit à la disparition de FSH 1 à 2 jours après l'apparition de la nouvelle vague.

Ils font ressortir :

- a) que la présence de FSH est nécessaire pour assurer le recrutement des follicules d'une nouvelle vague,
- b) que le déclin rapide de la FSH entraîne la

sélection du follicule dominant. L'origine de ce déclin de la sécrétion de FSH est attribué d'une part à l'action inhibitrice indirecte plus ou moins précoce des nouveaux follicules en croissance et d'autre part à l'abaissement important de la sécrétion hypophysaire après la libération initiale de la FSH stockée. Ce dernier serait responsable de la sélection et précéderait le mécanisme d'inhibition qui ne se mettrait en place qu'avec l'apparition de la sécrétion d'inhibine qui serait issue du follicule dominant.

- 10 c) qu'un certain état réfractaire à l'action de FSH apparaît après la période de sélection au moment de la sécrétion basale de FSH et serait dû à l'action inhibitrice directe des follicules en croissance.

15 Les mécanismes d'action de la FSH dans la sélection du follicule dominant chez les femelles bovines ont été également décrits dans d'autres espèces et plus spécialement chez les femelles ovines, qui, à la différence des femelles bovines, présentent un anoestrus saisonnier (A.S. McNeilly, W. Crow, J. Bordes et G. Evans, J. Reprod. 20 Fert. Suppl. 45, 1992, 5-19). Ces auteurs ont pu montrer que le recrutement et la croissance des follicules ovulatoires ne dépendaient que de l'apport de FSH en présence d'une sécrétion basale de LH en utilisant un modèle d'anoestrus qui est obtenu par l'administration continue et prolongée 25 d'un analogue agoniste de GnRH (Busereline), décrit antérieurement (A.S. McNeilly, H.M. Fraser, J. of Endocrin., 1987, 115, 273-282). Ils ont démontré également l'importance de la sécrétion pulsée de la LH (Luteinizing Hormone) et sa compensation par un apport accru de FSH dans la sélection du 30 ou des follicules dominants pendant la phase lutéale de l'espèce ovine en appliquant à leur modèle expérimental des décharges de LH à la fréquence de ceux de la phase lutéale (1 toutes les 4 heures). Les auteurs ont observé que des brebis mises en anoestrus par un traitement prolongé à l'aide d'un analogue agoniste de LHRH et soumises à un

traitement par la FSH pendant 120 heures développaient des follicules oestrogéniques comparables à ceux d'un cycle normal. L'administration de la hCG (gonadotrophine chorionique) a entraîné une ovulation supérieure à la normale, suivie de la formation de corps jaunes sécrétant des quantités normales de progestérone (A.M. Picton, C.G. Tsonis, A.S. McNeilly, J. of Endocrin., 1990, 126, 297-307). Ils ont également observé que les ovocytes obtenus ont pu être fécondés par insémination intra-utérine (G. Evans, J. Brooks, W. Crow, A.S. McNeilly, non publié et cité dans J. Reprod. Fert. Suppl. 45, 1992, 5-19).

Des différences existent cependant entre les caractères de la physiologie ovarienne, polyovulatoire et saisonnière entre les femelles ovines et les femelles bovines. Notamment, pour certains auteurs (M.A. Driancourt, R. Webb, R.C. Fry, J. of Reprod. Fert., 1991, 93, 63-70), la folliculogénèse chez les femelles ovines présenterait certaines particularités la différenciant de celle des femelles bovines : c'est ainsi que le follicule dominant de la femelle ovine ne produirait pas de signal inhibant les autres follicules.

Aux difficultés rencontrées dans les techniques de superovulation des femelles bovines s'ajoute la trop grande variabilité des résultats obtenus dans la pratique.

En effet, si l'on peut avancer une moyenne de 4,5 à 5,5 embryons transférables par traitement de superovulation, ce nombre varie en fait dans la pratique entre 0 et 15 embryons environ sans qu'il soit possible de contrôler cette variabilité. Les objectifs recherchés sont donc avant tout de rechercher une méthode permettant d'obtenir un nombre d'embryons satisfaisant et cela d'une manière fiable en ce qui concerne la constance du nombre d'embryons transférables pour chaque traitement de superovulation.

Lors de travaux sur la superovulation dirigée des

femelles bovines, la demanderesse a découvert qu'il était possible de s'affranchir de toutes les contraintes physiologiques qui conduisaient les auteurs à déterminer de manière précise le moment propice pour essayer d'induire une
5 superovulation, en amenant la femelle bovine dans un état d'anoestrus plus intense que l'état d'anoestrus physiologique et qui sera qualifié ci-après de profond. Il se caractérise par une désensibilisation de l'hypophyse à l'action de la LHRH endogène.

10 En outre, il a été découvert que l'on pouvait maintenir un état d'anoestrus profond chez la femelle bovine, pouvant atteindre ou dépasser cent jours, au cours duquel, et cela est très surprenant et avantageux, il est possible de réaliser plus d'une superovulation menée
15 jusqu'au stade de récolte des embryons.

L'invention a donc pour objet une méthode de superovulation dirigée des femelles bovines, comprenant les étapes suivantes :

- administrer à l'animal un analogue de la LHRH de manière à
20 désensibiliser l'hypophyse à l'action de la LHRH endogène, ce qui induit un état d'anoestrus profond caractérisé notamment par l'arrêt du développement des follicules antraux,
- à l'instant de son choix à l'intérieur de la période
25 d'anoestrus profond ainsi induite, administrer à l'animal de l'hormone FSH, associée ou non à la LH, de manière à induire le recrutement et le développement des follicules ovulatoires,
- en fin de développement de ces follicules, administrer à
30 l'animal une hormone choisie parmi le groupe consistant en LH et hCG, de manière à déclencher l'ovulation de ces follicules.

La méthode de superovulation proposée consiste donc à décider du moment du recrutement des follicules, de stimuler leur croissance par un traitement par l'hormone

gonadotrope FSH associée ou non à LH, à isoler les follicules en croissance de toute action inhibitrice ou stimulatrice indirecte ayant pour origine l'action ovarienne sur l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien pour supprimer ou
5 diminuer fortement la divergence entre follicules ovulatoires et non ovulatoires et provoquer l'ovulation par un apport, à un moment déterminé du développement des follicules, de la LH ou de l'hCG en quantité et pendant un temps suffisant.

10 Ces conditions sont remplies au cours de l'anoestrus profond que la méthode de traitement conforme à l'invention entraîne. Il est tel qu'il permette le développement des follicules antraux jusqu'au stade de prérecrutement. Cet état d'anoestrus qui est obtenu et qui
15 est décrit dans les exemples a limité la croissance des follicules décelables à une valeur ne dépassant pas 5 mm avec l'agoniste D.Trp⁶-LHRH et 14 mm avec l'agoniste Des-Gly-D.Trp⁶-LHRH éthylamide. Le mécanisme peut sans doute être rapporté à la suppression de la sécrétion de la LH
20 pulsée et à l'abaissement de la sécrétion basale de FSH, ainsi qu'à la suppression des mécanismes d'inhibition indirecte partant des ovaires.

Le nouveau mode de sécrétion des hormones gonadotropes a entraîné la suppression des cycles oestriens.
25 Cet état d'anoestrus est contrôlé, après la disparition de la phase lutéale existant au moment de l'application du traitement (moment préféré), par le maintien du taux de progestérone plasmatique au-dessous du seuil de détection. Le traitement commence de préférence au début de cette phase
30 lutéale.

La désensibilisation de l'hypophyse à l'action de l'hormone LHRH endogène peut être obtenue notamment soit par l'administration d'un analogue agoniste de LHRH à dose élevée (supraphysiologique) et continue, soit par l'administration d'un analogue antagoniste de LHRH, pendant

le temps nécessaire à la mise en place et au maintien de l'anoestrus profond permettant l'application du ou des traitements successifs de superovulation, de fertilisation des ovocytes par insémination artificielle et de récolte des
5 embryons, qui sera suivie de leur transfert avant ou après congélation. Ces trois dernières techniques sont les techniques habituelles utilisées par les personnes spécialisées dans les opérations d'insémination artificielle, de récolte et de transfert des embryons.

10 Plutôt que de recourir à de multiples injections, on préfère utiliser des formulations permettant la libération continue de l'analogue de la LHRH sur une durée qui détermine la durée de la phase d'anoestrus profond.

Pour ce faire, on dispose des nombreuses
15 techniques mises au point pour la préparation des formulations à libération continue, notamment à base de polymères dégradables, en particulier poly (lactide-glycolide) ou poly (lactique-glycolique), ou de corps gras, notamment acides gras ou esters d'acides gras ou de
20 polyéthylène-glycol, réalisées notamment sous forme de films, implants ou microsphères.

On préférera des microsphères de poly(lactide-glycolide) ou de poly(lactique-glycolique), ou éventuellement d'autres compositions, préparées notamment
25 selon le procédé décrit dans la demande de brevet français FR-A-2 693 905. Le procédé de préparation décrit dans les essais est conforme à cette demande antérieure.

Par analogue agoniste de la LHRH, il faut entendre comme il est d'usage toute molécule possédant les propriétés
30 biologiques de la LHRH naturelle, c'est-à-dire notamment action sur l'hypophyse déclenchant une sécrétion de LH et de FSH. Il peut également s'agir de la LHRH elle-même. De nombreux analogues agonistes de la LHRH sont aujourd'hui connus des spécialistes et il n'entre donc pas dans le cadre de cette demande de les citer tous. Ils peuvent être

d'origine naturelle, de recombinaison ou synthétique, c'est-à-dire obtenus par synthèse chimique complète ou par modification chimique d'une molécule naturelle, par exemple par substitution d'acides aminés et/ou modification des extrémités carboxyterminale ou aminoterminal. L'invention utilise préférentiellement l'analogue D.Trp⁶-LHRH (brevet FR-A-2 313 940) ou le Des-Gly-D.Trp⁶-LHRH éthylamide (brevet FR-A-2 397 192).

L'effet recherché avec l'agoniste est une saturation des récepteurs hypophysaires de la LHRH qui dure tout au long de la période d'anoestrus profond qui a été choisie. L'agoniste est donc administré de manière que, durant toute la période d'administration, il soit en concentration supraphysiologique dans le sang, ce qui signifie que la concentration en agoniste reste à un niveau toujours supérieur aux pics de sécrétion de LHRH endogène par l'hypothalamus. Il s'agit là de l'application à l'hypophyse du phénomène bien connu de désensibilisation (appelé "downregulation" des récepteurs de la LHRH par les Anglo-Saxons).

Pour un analogue donné, la posologie dépend de la formulation qui elle-même définit la durée de libération. On ne peut pas en effet définir la teneur plasmatique minimale requise en analogue car, en dessous d'un certain seuil, les techniques ne permettent plus de détecter et mesurer la concentration réelle en analogue. Lors de l'anoestrus profond, on constatera comme dans l'anoestrus léger une disparition persistante de la sécrétion de progestérone (dosage par les techniques usuelles). Toutefois, l'effet l'anoestrus profond recherché se caractérise spécifiquement par un arrêt du développement folliculaire pendant toute la phase d'anoestrus profond, cet état pouvant être confirmé notamment par des examens échographiques. Notamment, l'examen échographique révélera essentiellement l'existence de follicules de diamètre ne

dépassant pas 14 mm environ, de préférence 10 mm environ. Il est aisé de déterminer les doses d'analogue qui sont nécessaires en liaison avec une formulation donnée, en recourant à des essais et en vérifiant, par les techniques
5 ci-dessus, l'obtention d'un anoestrus profond sur une période donnée, en s'aidant des essais décrits plus loin. Une autre caractéristique spécifique de l'état d'anoestrus profond est sans doute la suppression de la FSH pulsée. Il s'agit là cependant d'une caractéristique difficile à mettre
10 en évidence, notamment dans la pratique courante, en raison des difficultés de dosage.

Les doses d'agonistes pourront être les suivantes:

- pour une formulation de libération de l'ordre de 40 à 50 jours : de 15 à 150 mg, notamment de 25 à 100 mg.
- 15 - pour une formulation de libération de l'ordre de 85 à 100 jours : de 30 à 300 mg, notamment de 50 à 200 mg, soit environ le double des doses choisies pour la libération plus courte.

On remarque que le passage à une formulation de
20 durée de libération double nécessite le doublement de la dose. Cette règle dose/durée pourra être transposée à des formulations de durées de libération différentes.

Les doses minimales pourront être augmentées ou diminuées pour des animaux dont le poids s'écarte
25 sensiblement de la moyenne arbitraire des 500 kg (respectivement supérieur à 500 kg et inférieur à 500 kg)

Pour le D.Trp⁶-LHRH, on a pu déterminer des doses efficaces de 150 mg d'analogue agoniste avec une libération continue de l'ordre de 40 à 50 jours et de 300 mg avec une
30 libération continue de l'ordre de 85 à 100 jours, et même de 50 mg pour avec une libération de l'ordre de 40 jours.

De préférence, pour une formulation à libération continue de l'ordre de 40 à 50 jours, on administre à l'animal une dose de cet agoniste de la LHRH comprise entre 40 et 150 mg environ et de préférence environ 50 et 100 mg.

Pour une formulation de type 85 à 100 jours environ, la dose peut être comprise entre 100 et 300 mg environ.

De façon avantageuse, le Des-Gly-D.Trp⁶-LHRH éthylamide s'est révélé efficace à des doses légèrement inférieures à celles du précédent ; on a notamment pu démontrer une efficacité aux doses de 16,7, 33,7 et 50,1 mg d'agoniste avec une durée de libération de l'ordre de 40 à 50 jours environ. La dose efficace dans ces conditions est supérieure à 16-17 mg et même à 15 mg environ, de préférence supérieure à 25 mg, notamment comprise entre 30 et 40 mg environ et plus particulièrement de l'ordre de 33 ou 34 mg, d'agoniste pour une formulation de durée de libération de l'ordre de 40 à 50 jours.

La dose efficace pour une formulation de libération de 85 à 100 jours environ correspond de préférence environ au double de la dose pour 40 à 50 jours. On pourra donc administrer notamment une dose supérieure à 30 mg, en particulier une dose comprise entre 60 et 80 mg.

Si l'on ne souhaite réaliser qu'une seule phase de superovulation, on choisira avantageusement des formulations à libération courte, par exemple de l'ordre de 40 à 50 jours, afin que l'animal retrouve rapidement son état normal après la récolte des embryons.

Les formulations à plus longue durée de libération seront plus appropriées à l'induction de plusieurs phases de superovulation successives au cours d'un anoestrus profond unique. On a toutefois démontré que cela était aussi possible avec la libération courte de 40 à 50 jours.

L'invention prévoit aussi l'utilisation d'analogues antagonistes de la LHRH. Il s'agit là de ce qu'il est communément convenu d'appeler les molécules s'opposant à l'action de la LHRH endogène par leur fixation sur les récepteurs spécifiques à cette hormone. Leur action est plus rapide que celle des agonistes et requiert une concentration permettant de bloquer les récepteurs sur la

durée choisie pour l'anoestrus profond. Les antagonistes ne provoquent pas un effet de stimulation premier de courte durée de la sécrétion de LH et FSH, comme c'est le cas avec les agonistes avant d'obtenir l'état de désensibilisation.

5 On connaît un grand nombre d'antagonistes de la LHRH. On pourra notamment utiliser les antagonistes décrits dans la demande de brevet internationale WO 92/19651 (agonistes selon les séquences SEQ ID NO : 1 et NO : 2 décrites dans cette demande) et les agonistes ORG 30850
10 (G.H.J. Deckers et al., J. Steroid Biochem. Molec. Biol., vol. 42, 705 - 712, 1992), Antide (K. Wallen et al., Physiology & Behavior, vol. 50, 429-435, Pergamon Press plc, 1991). Voir aussi dans V.J. Csernus et al., P.N.A.S. USA, vol. 89, 5759 - 5763, 1992.

15 La libération continue des agonistes de LHRH (ou GnRH) a déjà été décrite chez les bovins dans un but différent de celui qui fait l'objet de l'invention. Les administrations de la GnRH synthétique à la génisse prépubère (S.E. Dodson et al., J. Reprod. Fertil., 1988, 82, 526-538) ou de la buséréline (F. Grassalli et al., Anim.
20 Reprod. Sci., 1993, 32, 153-161) sont effectuées à faible dose, sont limitées à 10-15 jours, et ont pour but le déclenchement d'une ovulation précoce. Les auteurs ont observé une forte augmentation de la LH dès l'administration
25 de GnRH ou de son agoniste. Faisant suite à cette libération précoce succède une sécrétion basale de LH augmentée (F. Grasselli, 1993) ou abaissée (S.E. Dodson, 1988). Cette diminution de la sécrétion basale de LH est également observée par traitement de vaches en post-partum à faible
30 dose à l'aide d'implants de buséréline (B.J. McLeod et al., Anim. Reprod., Sci., 1991, 24, 1-11) et est rapportée à un état de downregulation ou désensibilisation de l'hypophyse. Ces travaux ne sont pas orientés vers la superovulation, ils visent à diminuer la période prépubère et à obtenir une ovulation précoce pour les deux premiers et à supprimer

l'anoestrus post-partum pour l'emploi de doses faibles de GnRH ou de ses agonistes pour le dernier.

Le recrutement et la croissance folliculaire sont assurés par un apport de FSH, qu'elle soit une hormone
5 d'extraction FSH porcine ou ovine ou bovine ou équine, ou qu'elle soit une hormone FSH de recombinaison. Cet apport par voie parentérale est réalisé par administration au moins deux fois par jour, à intervalle régulier, ou par un système à relargage continu (par exemple tel que décrit pour
10 l'analogue de la LHRH). Cet apport est maintenu de préférence pendant de 4 à 7 jours. L'administration de LH ou d'hCG est de préférence effectuée pendant de 1 à 2 jours environ, et commence de préférence le dernier jour de l'administration de FSH. On évitera en général d'administrer
15 la LH ou l'hCG pendant les chaleurs. De préférence, l'administration se fera lorsque la taille des follicules sera d'au moins 14 mm, notamment de l'ordre de 14-15 mm. La LH utilisée est soit une hormone d'extraction, porcine, ovine ou bovine ou équine ou une hormone de recombinaison.

20 L'invention a aussi pour objet la méthode elle-même, telle que définie ci-dessus, qui consiste à administrer à l'animal un analogue, agoniste ou antagoniste, de la LHRH de manière à désensibiliser l'hypophyse à l'action de la LHRH endogène, pour obtenir un anoestrus
25 profond.

En variante, la désensibilisation de l'hypophyse à la LHRH endogène peut aussi être réalisée par immunoneutralisation anti-LHRH par voie active ou passive.

Enfin, l'invention a encore pour objet un kit de
30 superovulation pour les femelles bovines, comprenant, séparément, une formulation à libération continue comprenant comme principe actif un analogue de la LHRH, une formulation comprenant comme principe actif de l'hormone FSH et une formulation comprenant un principe actif choisi dans le groupe consistant en hormone LH et hormone hCG. Les

formulations sont notamment conformes à ce qui a été décrit ci-dessus.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail dans ce qui suit, avec la description des modes
5 préférés de préparation des formulations d'analogue de la LHRH, la présentation d'essais de mise en anoestrus profond et la description des étapes subséquentes de la méthode de superovulation.

Les figures annexées montrent :

- 10 - à la figure 1, un graphe présentant, pour la vache n° 1, le profil de la concentration plasmatique de progestérone, déterminée par dosage radioimmunologique, après injection au jour 0 d'une formulation PLG 50:50 / D.Trp⁶-LHRH (150 mg d'analogue agoniste) ayant un profil de libération de
15 l'ordre de 40 jours, le plateau qui correspond à l'absence de détection de progestérone plasmatique représentant la phase d'anoestrus profond - ce graphe correspond au tableau 1 ;
- à la figure 2, un graphe analogue à celui de la figure 1, pour la vache n° 4, traitée dans les mêmes conditions que la
20 vache n° 1 ;
- à la figure 3, un graphe analogue aux précédents, pour une formulation PLG 65:35 / D.Trp⁶-LHRH (300 mg d'analogue agoniste) ayant un profil de libération de l'ordre de 85 à
25 100 jours - vache n° 5 - ce graphe correspond au tableau 2 ;
- à la figure 4, un graphe analogue à celui de la figure 3, pour la vache n° 6, traitée dans les mêmes conditions que la vache n° 5 ; et
- 30 - à la figure 5, un graphe présentant le profil de la concentration plasmatique de progestérone d'une vache témoin n'ayant pas reçu de formulation d'analogue de la LHRH - les cycles se déroulent normalement.

A - PREPARATION DES FORMULATIONS D'ANALOGUES DE LA LHRH.

Plusieurs méthodes de formulation des analogues de

LHRH permettent d'obtenir une libération prolongée et continue du principe actif à partir de la forme galénique. Les méthodes citées ci-dessous permettent de moduler la durée de libération de l'analogue en fonction de certains paramètres de formulation. Ces méthodes font appel à deux catégories d'excipients :

- des polymères dégradables représentés en particulier par la famille des poly(lactide-glycolide) et poly(lactique-glycolique);
- 10 - des corps gras représentés en particulier par des acides gras et des esters d'acide gras ou de polyéthylène-glycol.

La première méthode de formulation fait appel à des polymères dégradables de la famille des poly(lactide-glycolide) et poly(lactique-glycolique) (PLG). Ces polymères présentent une biocompatibilité très satisfaisante et ont la capacité de s'hydrolyser pour générer des composants naturels, l'acide lactique et l'acide glycolique. La vitesse d'hydrolyse de ces polymères est modulable en fonction essentiellement du ratio des comonomères lactide et glycolide, de la masse moléculaire des polymères, et des isomères lactide utilisés. Cette vitesse est maximale lorsque le ratio est égal à 50/50, puis elle diminue lorsque la proportion de lactide augmente. Cette propriété est utilisée pour moduler la durée de libération des analogues LHRH à partir d'une forme galénique réalisée avec ces polymères. Les analogues de LHRH et plus particulièrement les agonistes de LHRH sont des peptides insolubles dans une matrice de PLG. Ces composés se présentent généralement sous forme d'une microdispersion dans l'excipient PLG. La forme galénique peut être variable: films, implants ou microsphères. Cette dernière forme galénique présente l'avantage d'être aisément injectable, après remise en suspension dans un liquide adéquat. Les méthodes de microencapsulation permettant d'obtenir cette forme galénique sont variables, essentiellement: la

microencapsulation par coacervation, par évaporation de solvant, et la méthode d'atomisation ou "spray-drying". La méthode de microencapsulation par évaporation de solvant est décrite dans l'exemple n° 1.

- 5 Les mécanismes de libération de l'agoniste LHRH à partir de la forme galénique sont variés :
- Libération par dissolution rapide de l'agoniste situé en périphérie de la forme galénique, et exposé directement aux fluides biologiques.
 - 10 - Libération par percolation : ce mode de diffusion d'un principe actif dispersé dans une matrice polymère hydrophobe est lié à l'interconnexion des particules de principe actif entre elles, ce réseau interconnecté étant lui-même en contact avec le milieu extérieur. La libération du principe
 - 15 actif est liée à la pénétration progressive des fluides biologiques dans le réseau, permettant la dissolution du principe actif et sa diffusion dans le milieu extérieur. Ce mode de libération est modulé quantitativement et dans le temps par la proportion de principe actif dispersé dans la
 - 20 matrice polymère, la solubilité du principe actif, sa granulométrie.
 - Libération liée à l'hydrolyse du polymère : l'hydrolyse du polymère, par exemple un PLG, scinde les chaînes polymériques en fragments plus courts hydrosolubles à terme.
 - 25 Ce phénomène induit une augmentation de l'hydrophilie et de la porosité de la forme galénique, permettant la pénétration des fluides biologiques et l'extraction du principe actif. Ce mécanisme de libération est modulé dans le temps par la vitesse d'hydrolyse du polymère et par la masse moléculaire
 - 30 initiale du polymère.
- Ces trois mécanismes interviennent lors de la libération d'agonistes LHRH à partir de microsphères de PLG, et sont à l'origine de cinétiques de libération triphasiques :
- 1ère phase: libération instantanée ou "burst effect", se produisant peu après l'administration du

produit.

2ème phase: phase de diffusion liée à la percolation, dont le débit de libération est contrôlé par la proportion d'agonistes de LHRH utilisée dans la formulation de microsphères. La durée de cette phase est contrôlée par le ratio de co-monomères lactide/glycolide, et par la masse moléculaire initiale du polymère. Cette phase est d'autant plus courte que le ratio lactide/glycolide est proche de 50/50 et la masse moléculaire initiale du polymère est faible.

3ème phase : phase de libération liée à l'hydrolyse du polymère dont la durée est contrôlée essentiellement par le ratio lactide/glycolide. Cette durée peut varier de un mois environ à plus d'une année. Le débit de libération est généralement supérieur à celui de la phase précédente.

Le profil triphasique de libération peut être modifié avec les paramètres de formulation:

- La réduction de la durée, voire la disparition de la 2ème phase est observée avec des polymères de forte vitesse de dégradation et de faible masse moléculaire initiale, par exemple des polymères PLG50:50 de faible masse moléculaire, ceci permettant d'obtenir des débits de libération relativement constants.
- L'augmentation du débit de libération pendant la 2ème phase est obtenue en augmentant la proportion de principe actif dans la formulation, la cinétique de libération tendant vers un profil régulièrement décroissant avec le temps.

Des profils de libération non triphasiques, mais relativement constants ou régulièrement décroissants sont également obtenus avec des polymères de faible masse moléculaire, par exemple des poly (D.L. lactide) de masse moléculaire de l'ordre de 2000. Ces polymères peuvent être utilisés purs dans la formulation, ou préalablement mélangés

avec des polymères de plus haute masse moléculaire, puis formulés.

La combinaison des paramètres de formulation permet d'obtenir des durées et des profils de libération
5 contrôlés. La durée totale de libération d'un agoniste LHRH peut être ajustée pour atteindre des périodes variant de quelques jours à plus d'un an.

Une deuxième méthode de formulation fait appel à des corps gras, par exemple des acides gras ou des esters
10 d'acides gras, formulés en implants ou microsphères avec le principe actif. Le mécanisme de libération d'un agoniste LHRH à partir de ces formulations est lié:

- à la diffusion du principe actif dans l'excipient lipidique. La durée de libération d'un agoniste LHRH peut
15 être ajustée:

. par la proportion d'agoniste incorporée dans la formulation: la durée de libération décroît avec l'augmentation de la proportion d'agoniste incorporée.

. par la valeur HLB (Balance Hydrophile Lipophile) de
20 l'excipient lipidique: l'augmentation par exemple de 1 à 5 de la valeur HLB de l'excipient lipidique permet de réduire de 5 mois à une semaine la durée totale de libération d'un agoniste LHRH incorporé dans des implants lipidiques.

- à l'érosion de l'excipient lipidique: ce phénomène est
25 d'autant plus rapide que la température de fusion de l'excipient lipidique utilisé est faible. La durée de libération de l'agoniste LHRH peut être contrôlée en modifiant ce paramètre.

30 B - ESSAIS DE MISE EN ANOESTRUS PROFOND

La mesure des concentrations plasmatiques de la D.Trp⁶-LHRH libérée et de la progestérone est effectuée par méthode radioimmunologique. Le dosage radioimmunologique de la D.Trp⁶-LHRH plasmatique repose sur le principe d'une réaction d'inhibition compétitive entre la D.Trp⁶-LHRH

marquée à $1,^{125}\text{I}$ en quantité constante et la D.Trp⁶-LHRH étalon ou celle contenue dans les échantillons de plasma, vis-à-vis des sites de liaison d'un sérum anti-D.Trp⁶-LHRH. La quantité de D.Trp⁶-LHRH est exprimée en ng/ml de plasma.

5 Le dosage radioimmunologique de la progestérone plasmatique est effectué par méthode directe à l'aide de la progestérone marquée par $1,^{125}\text{I}$. Elle repose sur une réaction d'inhibition compétitive entre la progestérone marquée en quantité constante et la progestérone étalon ou
10 celle contenue dans les échantillons de plasma. La quantité de progestérone est exprimée en ng/ml de plasma.

1er exemple (3 tableaux (1 à 3), 2 figures (1 et 2))

Le traitement de désensibilisation a été appliqué
15 sur 4 vaches à l'aide de l'analogue agoniste de la LHRH, la D.Trp⁶-LHRH. Celle-ci fut incorporée dans des microsphères de copolymères lactique-glycolique qui assurent une concentration plasmatique décelable chez la femelle bovine pendant 40 jours pour une première formulation et 85-100
20 jours pour la seconde.

Préparation et administration de microsphères de PLG incorporant l'analogue D.Trp⁶-LHRH:

a) Formulation PLG50:50

Cette formulation permet de libérer l'agoniste
25 D.Trp⁶-LHRH pendant environ 40 jours à des niveaux détectables chez la vache. 45 mg d'un lyophilisat de D.Trp⁶-LHRH (trifluoroacétate) sont pesés puis dispersés dans une solution composée de 1455 mg de poly(D.L. lactide-glycolide) 50:50 de viscosité inhérente 0,4 dl/g, dans 5,4 ml de
30 dichlorométhane sous agitation. Ce solvant permet la dispersion fine du lyophilisat et permet la solubilisation du polymère. Lorsque la répartition du peptide est homogène, la dispersion est injectée à travers un tube de 2 mm de diamètre dans 450 ml d'une solution d'alcool polyvinylique à 1% dans de l'eau déminéralisée à 25°C, sous l'agitation

d'une hélice tournant à 700 tours par minute. Deux gouttes d'une émulsion silicone antimousse sont réparties, puis le dichlorométhane est évaporé par diffusion d'air comprimé dans le mélange. Après évaporation, les microsphères durcies
5 sont récoltées par filtration sous vide, lavées à l'eau déminéralisée puis sont séchées sur un papier filtre. Un lavage complémentaire avec 40 ml de trichloro 1,1,2 trifluoro 1,2,2 éthane permet d'éliminer le silicone antimousse résiduel. Les microsphères sont séchées, puis
10 stockées à + 4°C.

Cette opération est répétée jusqu'à l'obtention d'une quantité suffisante de microsphères incorporant D.Trp⁶-LHRH. La quantité de D.Trp⁶-LHRH présente dans les microsphères est déterminée par une méthode d'extraction
15 puis dosage en chromatographie liquide haute performance.

Administration aux vaches : La quantité de microsphères équivalent à 150 mg de D.Trp⁶-LHRH incorporée est répartie dans 2 seringues. Les microsphères de chaque seringue sont mises en suspension dans 20 ml d'un liquide
20 visqueux composé de 2% de carboxyméthyl-cellulose et de 0,2% de Tween 80 en solution dans de l'eau physiologique, puis sont injectées par voie intramusculaire profonde dans l'encolure.

b) Formulation PLG65:35

Cette formulation permet de libérer l'agoniste pendant environ 85-100 jours. Le même mode de préparation est adopté avec un polymère poly(D.L. lactide-glycolide) 65:35 de viscosité inhérente 0,34 dl/g: 90 mg d'un lyophilisat D.Trp⁶-LHRH sont pesés puis dispersés dans une
30 solution composée de 1410 mg de poly(D.L. lactide-glycolide) 63:35 dans 3 ml de dichlorométhane, sous agitation. Les étapes ultérieures sont identiques à la description précédente.

Administration : la quantité de microsphères équivalent à 300 mg de D.Trp⁶-LHRH incorporée est répartie

dans 2 seringues, puis administrée dans les mêmes conditions que précédemment.

L'administration des microsphères à base de copolymères lactique-glycolique a été effectuée en début de la phase lutéale. Elle a entraîné sur tous les animaux un allongement de la phase lutéale, par comparaison avec la durée de la phase lutéale du cycle précédent.

La disparition persistante de la sécrétion de progestérone a défini l'anoestrus en l'absence d'autres examens (échographie, dosages de LH et FSH). La fin de la période d'anoestrus est moins précise et doit intervenir quelques jours avant la réapparition de la progestérone.

L'examen échographique fut limité à 2 observations à une semaine d'intervalle à des moments précis du traitement, d'une part vers la fin probable de son efficacité, un mois après la disparition de trace décelable de D.Trp⁶-LHRH dans le plasma, d'autre part pendant la phase stationnaire du traitement, marquée par une concentration stable et caractéristique de l'agoniste de LHRH. Cet anoestrus a pu être classé en deux états bien différents dans l'un et l'autre moment, un anoestrus profond pendant la phase correspondant à la mise en évidence dans le plasma de l'agoniste, un anoestrus léger un mois après la disparition plasmatique de D.Trp⁶-LHRH. L'état d'anoestrus profond, pendant lequel les follicules ne dépassent pas le diamètre de 3-4 mm, correspond à l'état nécessaire à l'application du traitement de superovulation. Il permet le recrutement par l'apport de la FSH (vaches 5 et 6). Il est suivi d'un état d'anoestrus moins profond pendant lequel le recrutement et la sélection des follicules sont observés spontanément (vaches 1 et 4). Cet anoestrus léger est comparable à l'anoestrus physiologique observé après la mise-bas ou pendant la gestation. Il précède la réapparition de l'oestrus dans cette expérimentation.

Le tableau 1 et les figures 1 et 2 concernent les vaches 1 et 4 ayant reçu un traitement de désensibilisation de courte durée (40 jours décelables). La fin de la phase lutéale commence 21 jours après l'administration en début de phase lutéale pour les vaches 1 et 4. L'examen échographique fut effectué 1 mois après la disparition de la D.Trp⁶-LHRH plasmatique mesurable, soit respectivement 65 et 72 jours pour la vache 1 et 58 et 65 jours pour la vache 2 après l'administration des microsphères ; il a conduit aux observations suivantes (nombre de follicules F et diamètre en mm) qui traduisent un anoestrus léger :

a) Vache n° 1 (1393)

	1er examen	2e examen
	+ 65 j	+ 72 j
ovaire droit	1 F 12 mm 5 F 4 mm	1 F 12-13 mm 1 F 5 mm
ovaire gauche	2 F 6 mm 4 F 4 mm	1 F 20 mm

b) Vache n° 4 (1866)

	1er examen	2e examen
	+ 58 j	+ 65 j
ovaire droit	2 F 4 mm	1 F 12 mm 4 F 3 mm
ovaire gauche	0 F (non décelé)	5 F 4 mm

Le tableau 2 et les figures 3 et 4 concernent les vaches n° 5 et 6 ayant reçu un traitement de désensibilisation de longue durée (D.Trp⁶-LHRH décelable dans le plasma pendant 86 et 103 jours). La fin de la phase lutéale commence, pour la vache n° 5, 15 jours, et pour la vache n° 6, 25 jours,

après l'administration en début de phase lutéale.

L'examen échographique fut effectué pendant la phase de libération stable et caractéristique des microsphères de D.Trp⁶-LHRH respectivement 65 et 72 jours pour la vache n° 6 et 58 et 65 jours pour la vache n° 5 après l'administration des microsphères. Il correspond à la phase d'anoestrus profond au cours duquel aucun follicule supérieur à 5 mm n'est observé.

10 a) Vache n° 6

	1er examen + 65 j	2e examen + 72 j
ovaire droit	3 F 3 mm	4 F 3 mm
15 ovaire gauche	2 F 3 mm	3 F 3 mm

b) Vache n° 5

	1er examen	2e examen
20 ovaire droit	1 F 5 mm 1 F 3 mm	2 F 4 mm
ovaire gauche	3 F 3 mm	5 F 3 mm

25 Le tableau 3 et la figure 5 concernent les mesures de progestérone faites sur une vache témoin (1398).

Le retour de l'oestrus a été observé sur les 4 vaches.

Après le début du traitement de courte durée :

. 100 jours chez la vache 1 (1393)

. 80 jours chez la vache 4 (1866)

30

2e exemple - 2 tableaux (n° 4 et 5)

Le traitement de désensibilisation a été appliqué sur 6 vaches à l'aide de l'analogue agoniste de la LHRH, la D.Trp⁶-LHRH.

35

Il est appliqué en début de la phase lutéale à

l'aide de la formulation D.Trp⁶-LHRH/PLG 50-50 à la dose de 50 mg ou de 16,7 mg par vache.

a) Dose de 50 mg - tableau 4

. vache 1 - 1393

- 5 Suppression de la phase lutéale 14 jours après le début du traitement de désensibilisation.

Retour de la sécrétion de progestérone 114 jours après le début du traitement.

.vache 7 - 1901

- 10 Suppression de la phase lutéale 17 jours après le début du traitement de désensibilisation.

. vache 10 - 1923

Suppression de la phase lutéale 21 jours après le début du traitement de désensibilisation.

- 15 b) Dose de 16,7 mg - tableau 5

- vache 3 - 1398

Dose inefficace

- vache 4 - 1866

Dose inefficace

- 20 - vache 5 - 1867

Dose partiellement efficace

C - ETAPES ULTERIEURES A LA MISE EN ANOESTRUS PROFOND

1ère étape : Recrutement et développement des follicules.

- 25 Cette étape peut être déclenchée à tout moment de la phase d'anoestrus profond.

Il suffit de respecter :

- la période de mise en place de l'anoestrus profond après injection de la formulation d'analogue de la LHRH, celle-ci variant selon le type d'analogue, agoniste (plusieurs jours selon la formulation retard utilisée) ou antagoniste (immédiate: absence de phase de latence) ;
- 30 - le temps nécessaire pour aboutir aux embryons et à leur récolte, étant donné qu'il est préférable que l'ensemble des
- 35 opérations, y compris la récolte des embryons, soit réalisée

à l'intérieur de la phase d'anoestrus profond. A partir du début du traitement par la FSH, il faut compter de 18 à 21 jours environ jusqu'à la récolte des embryons.

5 Pour les formulations utilisées au cours des essais décrits plus haut, la période de mise en place de l'anoestrus profond est en moyenne de :

- PLG 50:50 : moins de 20 jours (environ 18 jours)
- PLG 65:35 : moins de 25 jours (environ 21 jours).

10 Cette période est facile à déterminer pour chaque formulation au cours d'un essai de mise en anoestrus et du suivi de l'évolution de la concentration en progestérone (et examen échographique et éventuellement mesure de la FSH pour confirmer l'état d'anoestrus profond).

15 Au jour choisi, on administre à l'animal de l'hormone FSH en présence éventuellement de l'hormone LH.

Formulation :

- hormone FSH d'extraction de préférence d'origine porcine, ovine (ou encore bovine ou équine), ou hormone de recombinaison ;
- posologie journalière selon l'origine de l'hormone : de 30 à 300 $\mu\text{g/j}$, de préférence entre 80 et 140 $\mu\text{g/j}$ environ, par exemple de l'ordre de 125 $\mu\text{g/j}$.
- autres constituants : éventuellement LH à un maximum de 40 à 60 $\mu\text{g/j}$.

Durée du traitement : de 4 à 7 jours, l'objectif étant d'obtenir des follicules de 14-15 mm environ.

On peut aussi choisir d'utiliser une formulation à libération continue du type décrit plus haut, permettant de libérer la dose journalière requise sur la période totale de 4 à 7 jours.

L'apport de FSH déclenche le recrutement et la croissance des follicules qui se trouvaient au stade de prérecrutement dans la phase d'anoestrus profond (follicules antraux). Après de 4 à 7 jours de traitement par la FSH, on

aboutit à des follicules ovulatoires.

2ème étape : Déclenchement de l'ovulation.

Le dernier jour du traitement à la FSH, on
5 administre en sus à l'animal de l'hormone LH ou de l'hormone
hCG.

Formulation :

- hormone d'extraction d'origine porcine, ovine, bovine ou
équine, ou hormone de recombinaison ;
- 10 - dose : de 2 à 6 mg/j pour LH ou de 3 000 à 6 000 UI/j pour
la hCG.

Pour les essais, on a choisi d'administrer 3 mg de
LH d'origine porcine par jour en 1 ou 2 administrations par
voie intramusculaire, pendant de 1 à 2 jours.

15 On peut avantageusement utiliser une formulation à
libération continue.

Ce traitement déclenche l'ovulation.

- On applique ensuite les étapes classiques des
méthodes de superovulation, jusqu'à la récolte des embryons,
20 à savoir :
- fertilisation des ovocytes par insémination artificielle,
 - récolte des embryons, et
 - transfert des embryons.

25 D - 3ème EXEMPLE : TRAITEMENT DE SUPEROVULATION UTILISANT
L'AGONISTE Des-Gly-D.Trp⁶-LHRH

L'expérimentation conduisant à démontrer la
faisabilité de la superovulation a été réalisée sur 6
femelles bovines mises en anoestrus profond obtenu par
30 l'administration de microsphères de PLG 50/50 incorporant le
Des-Gly-D.Trp⁶-LHRH éthylamide (dénommé agoniste dans la
suite du texte). Les microsphères ont été préparées selon la
méthode décrite au 1er exemple pour les doses d'agoniste
indiquées plus loin.

1. Le protocole expérimental.

1.1 Synchronisation de l'oestrus

L'oestrus précédant le traitement peut être synchronisé (ce qui est facultatif) par les méthodes bien
5 connues des spécialistes.

1.2 Détection de l'oestrus

Elle est effectuée 2 fois par jour à l'aide d'un taureau vasectomisé. Les génisses sont considérées en chaleur si elles acceptent le chevauchement.

10 1.3 Traitement de mise en anoestrus par injection des microsphères PLG/50-50 incorporant l'agoniste de LHRH.

Au jour 2 du cycle oestrien (2 jours après l'apparition des chaleurs).

Trois doses ont été utilisées : 16,7 ; 33,7 et 50,1
15 mg d'agoniste.

1.4 Examen échographique de l'ovaire.

L'observation des ovaires est enregistrée sur cassette vidéo. Elle est effectuée quotidiennement à partir de la détection des chaleurs qui précèdent le traitement de
20 désensibilisation hypophysaire jusqu'à la fin du traitement de superovulation.

1.5 Dosages hormonaux.

Les hormones FSH, LH et progestérone ont été dosées:

25 LH : 6 fois par jour, toutes les heures entre 8 et 12 heures à partir de la veille de l'injection de l'agoniste jusqu'au début du traitement de superovulation.

FSH: 2 fois par jour, à 8 et 9 h, à partir de la veille de l'injection de l'agoniste jusqu'au début du traitement de
30 superovulation. Le jour de l'injection de l'agoniste, 5 prélèvements ont été réalisés, toutes les heures entre 8 et 12 heures.

Progestérone : 1 fois par jour à partir de la veille de l'injection de l'agoniste jusqu'à la fin du traitement de superovulation.

Les animaux ont été leur propre témoin dans un cycle oestrien précédant le traitement.

1.6 Traitement de superovulation par les hormones gonadotropes sur les génisses en anestrus.

5 Pendant la période de l'anoestrus provoqué les animaux ont reçu 1 ou 2 traitements de superovulation.

Le premier traitement de stimulation de la folliculogénèse à l'aide de produit Stimufol (vendu par RHONE MERIEUX, FRANCE ; composition : FSH porcine 500 µg et
10 LH porcine 100 µg par flacon, à reprendre dans un volume de 10 ml) a débuté 10 jours après la disparition du dernier follicule présentant un diamètre supérieur à 10 mm et a été conduit dans les conditions habituelles d'un traitement de superovulation à dose quotidienne constante. La posologie
15 utilisée a été différente suivant les animaux. Les injections de Stimufol ont été effectuées 2 fois par jour en injection intramusculaire et ont été espacées de 10 à 12 heures.

Une injection de Prostaglandines (Prosolvine 3 ml)
20 a été effectuée à la 5e injection de Stimufol. Le traitement de Stimufol a été arrêté à l'apparition des chaleurs, au plus tôt après la 8e injection.

L'injection ovulante de LH porcine purifiée ou d'hCG a été effectuée au moment des chaleurs, au plus tôt 12
25 h après la 8e injection de Stimufol, ou après leur apparition sur le critère d'une taille folliculaire au moins égale à 14 mm.

1.7 Insémination artificielle.

12 h et 24 h après l'injection de LH ou de hCG.

30 1.8 Collecte des embryons.

Au jour 7 après la 1ère insémination.

2. Resultats

2.1 Dosage des hormones

2.1.1 LH

La concentration de LH augmente dans les 2 heures qui suivent l'injection de l'agoniste. Vingt-quatre heures plus tard, la concentration de LH se stabilise à un niveau basal (0,5 - 1,1 ng/ml) et varie peu.

5 Avant traitement par l'agoniste, les concentrations moyennes de LH entre J4 et J14 du cycle sur les mêmes animaux ne diffèrent pas de celles qui sont mesurées après traitement; seule l'erreur standard est plus importante avant traitement et traduit les fluctuations de
10 la sécrétion chez les non traités (0,07 - 0,139 ng/ml contre 0,015 - 0,022 ng/ml).

2.1.2. FSH

Après une augmentation de la concentration de FSH dans les heures qui suivent l'injection de l'agoniste (de
15 1,4 à 1,8 ng/ml) les valeurs redeviennent comparables à celles des valeurs témoins mesurées dans un cycle préalable ($0,36 \pm 0,036$ et $0,29 \pm 0,029$ pour les valeurs témoins des n° 27 et 99 et de $0,26 \pm 0,019$ à $0,43 \pm 0,024$ pour les valeurs des animaux 87, 08, 27, 99, 37 après traitement par
20 les agonistes).

2.1.3. Dosage de la progestérone.

Les concentrations maximales de 9 à 25 ng/ml apparaissant vers J10-J15 sur les traités, elles sont de 8-9 ng/ml vers J10-J14 dans les cycles témoins. La régression
25 des teneurs en progestérone intervient vers J15-J17 (cycles témoins) et J15-J22 chez les animaux traités par l'agoniste.

2.2 Croissance folliculaire avant le traitement de superovulation.

30 a) La réponse précoce à l'agoniste se traduit par la croissance de plusieurs follicules sur les 2 ovaires, le diamètre maximum allant de 8 à 16 mm, et par l'augmentation du nombre des follicules de diamètre 7-10 mm allant de 3 à 18 par animal et dont la régression intervient 4 à 8 jours après le traitement.

b) Une dizaine de jours après le traitement par l'agoniste, il y a absence de follicule préovulatoire, la taille maximale des follicules n'excède pas 6 à 14 mm de diamètre suivant les animaux et traduit l'état de l'ovaire de l'anoestrus. 2 animaux sur 6 ont développé des ovaires kystiques, de taille 20-25 mm ; chez l'un, il a régressé vers J16, chez l'autre (n° 08), qui ne fut pas utilisé pour la superovulation, il fut accompagné de chaleurs sans ovulation.

10 c) Aucune différence de réponse n'a été observée aux trois doses du traitement par l'agoniste.

2.3 Traitement de superovulation.

2.3.1. Croissance folliculaire

15 Au 1er jour de traitement de superovulation le nombre de follicules de la taille de 5 à 7,5 mm est supérieur ou égal à 10.

En fin de traitement, au moment d'induction de l'ovulation, la taille moyenne des follicules va de 11,9 à 15,9 mm suivant les animaux.

20 Exemples: génisse 37 (tableaux 6 et 7) et génisse 80 (tableaux 8 et 9) ayant reçu 50,1 mg d'agoniste et ayant subi deux traitements de superovulation successifs au cours de la même phase d'anoestrus profond.

25 Signification des abréviations utilisées dans les tableaux :

M = matin ; S = soir ; Pro. = prostaglandines ; CJ = corps jaune ; IA = insémination artificielle ; c = cellules.

2.3.2 Apparition des chaleurs.

30 Les génisses viennent en oestrus de 4 à 5 jours après le début des injections de Stimufol (tableaux 6-7, 8-9 et 10).

2.3.3. Nombre d'ovulations et d'embryons.

L'induction de l'ovulation n'a été efficace que lorsqu'elle intervenait sur des follicules de taille de 14-15 mm. Effectuée au moment des chaleurs sur des follicules

de taille inférieure, elle ne fut pas efficace.

L'ovulation a été confirmée sur 2 animaux (n° 37 et 80) lors de deux traitements de superovulation mis en oeuvre successivement au cours de l'anoestrus, par la
5 présence de corps jaunes.

L'insémination artificielle n'a été effectuée sur ces 2 animaux qu'au 2ème traitement de superovulation. Deux embryons dégénérés (stade 20-30 cellules) ont été récoltés sur le n° 37 (tableau 11).

10 2.3.4. La reprise de l'activité cyclique a été observée entre 55 et 100 jours après l'administration du traitement par l'agoniste.

2.4. Conclusion

15 Le traitement par l'agoniste de LHRH formulé dans les microsphères PLG 50/50 a été efficace pour établir l'anoestrus aux trois doses utilisées. La faisabilité du traitement de superovulation et de la fertilisation des ovocytes sur des animaux dont les ovaires ne sont soumis
20 qu'aux seules sécrétions basales des hormones gonadotropes hypophysaires a pu être démontrée en tenant compte du caractère particulier de la maturation des follicules liée à leur taille.

25

30

TAUX DE PROGESTERONE PLASMATIQUE (ng/ml)
TAUX DE DTRP6-LHRH PLASMATIQUE (ng/ml)

Tableau 1

VACHE 1 1393				VACHE 4 1868			
Date	nbr jour après Inj.	jour cycle	[Pg] (ng/ml)	Date	nbr jour après Inj.	jour cycle	[Pg] (ng/ml)
			formulation courte				formulation courte
4/12		4	0	4/12		0	0
7/12		7	2,2	7/12		2	0
9/12		9	4,2	9/12		4	0
11/12		11	2,7	11/12		6	3,1
14/12		14	3,2	14/12		9	5,4
16/12		16	5,0	16/12		11	4,2
18/12		18	2,9	18/12		13	7,7
21/12		21	0	21/12		16	4,4
23/12		2	0	23/12		18	3,9
26/12		5	0,2	26/12		21	0
Inj 28/12	0	7	0,6	28/12		2	0
28/12	0	7	1,0	30/12		4	1,1
29/12	1	8	2,3	2/1		7	2,5
30/12	2	9	2,9	Inj 4/1	0	9	3,9
31/12	3	10	5,4	4/1	0	9	5,0
2/1	5	12	5,6	5/1	1	10	4,5
4/1	7	14	6,4	6/1	2	11	9,2
6/1	9	16	8,9	7/1	3	12	9,1
8/1	11	18	10,3	8/1	4	13	13,4
11/1	14	21	11,9	11/1	7	16	13,4
13/1	16	23	4,8	13/1	9	18	17,7
15/1	18	25	0,4	15/1	11	20	17,2
18/1	21		0	18/1	14	23	6,0
20/1	23		0	20/1	16	25	3,1
22/1	25		0	22/1	18	27	0,7
25/1	28		0	25/1	21		0
27/1	30		0	27/1	23		0
			0,12				0,13
			9,40				0,80
			2,41				1,82
			1,16				0,87
			0,66				0,30
			0,05				0,27
			0,40				0,13
			0,48				0,00
			0,45				0,54
			0,43				0,30
			0,63				0,51
			1,41				0,39
			1,24				0,35
			1,74				0,36
			0,98				
			1,20				
			1,24				

0,29	0	25	29/1	1,04	0	32	29/1
0,50	0	28	1/2	0	0	35	1/2
0,48	0	30	3/2	0,28	0	37	3/2
0,59	0	32	5/2	0,30	0	39	5/2
0,56	0	35	8/2	0	0	42	8/2
0,41	0	37	10/2	0	0	44	10/2
0,19	0	39	12/2	0	0	46	12/2
0	0	42	15/2	0	0	49	15/2
0,10	0	44	17/2	0	0	51	17/2
0	0	46	19/2	0	0	53	19/2
0	0	49	22/2	0	0	56	22/2
0	0	51	24/2	0	0	58	24/2
0	0	53	26/2	0	0	60	26/2
0	0	56	1/3	0	0	63	1/3
0	0	58	3/3	0	0	65	3/3
0	0	60	5/3	0	0	67	5/3
0	0	63	8/3	0	0	70	8/3
0	0	65	10/3	0	0	72	10/3
0	0	67	12/3	0	0	74	12/3
0	0	70	15/3	0	0	77	15/3
0	0	72	17/3	0	0	79	17/3
0	0	74	19/3	0	0	81	19/3
0	0	77	22/3	0	0	84	22/3
0	0	79	24/3	0	0	86	24/3
0	0	81	26/3	0	0	88	26/3
0	0	84	29/3	0	0	91	29/3
0	0	86	31/3	0	0	93	31/3
0,2	0	88	2/4	0	0	95	2/4
2,2	0,2	91	5/4	0	0	98	5/4
2,6	2,2	93	7/4	0	0	100	7/4
3,0	2,6	95	9/4	0	0	102	9/4
1,6	3,0	98	12/4	0	0	105	12/4
8,0	1,6	100	14/4	0,9	0	107	14/4
	8,0				0		
					2		
					4		

16/4	102	16	3,9
19/4	105	0	0
21/4	107	2	0
23/4	109	4	0,4
26/4	112	7	2,6
28/4	114	9	4,0
30/4	116	11	3,9
3/5	119	14	6,9
5/5	121	16	7,1
7/5	123	18	5,5
10/5	126	21	6,8
12/5	128	0	0,8
14/5	130	2	0
17/5	133	5	0,6

16/4	109	7	1,1
19/4	112	9	2,9
21/4	114	11	4,9
23/4	116	14	5,9
26/4	119	16	5,3
28/4	121	18	7,8
30/4	123	21	4,6
3/5	126	0	0
+sm/5/5	128	2	0
+sm/7/5	130	4	0,6
10/5	133	7	2,1
12/5	135	9	3,0
14/5	137	11	3,7
17/5	140	14	4,0
19/5	142	16	3,8
21/5	144	18	2,5
24/5	147	21	0
26/5	149	0	0
28/5	151	2	0
31/5	154	5	1,1

TAUX DE PROGESTERONE PLASMATIQUE (ng/ml)
TAUX DE DTRP6-LHRH PLASMATIQUE (ng/ml)

Tableau 2

VACHE 5 1867						VACHE 6 1877					
Date	nbr jour après inj.	jour cycle	[Pg] (ng/ml)	[Dtrp6-LHRH] (ng/ml)		Date	nbr jour après inj.	jour cycle	[Pg] (ng/ml)	[Dtrp6-LHRH] (ng/ml)	
formulation longue						formulation longue					
4/12		2	0	-		4/12		3	0	-	
7/12		5	0	-		7/12		7	3,0	-	
9/12		7	1,7	-		9/12		9	3,1	-	
11/12		9	3,2	-		11/12		11	6,2	-	
14/12		12	3,1	-		14/12		14	4,3	-	
16/12		14	4,4	-		16/12		16	6,6	-	
18/12		16	4,5	-		18/12		18	2,4	-	
21/12		19	5,5	-		21/12		21	0	-	
23/12		21	0,1	-		23/12		2	0	-	
26/12		3	0	-		26/12		5	0	-	
28/12		5	0,2	-		28/12		7	0,5	0,10	
30/12		7	2,2	-		30/12		7	0,5	6,53	
2/1		10	2,1	-		29/12		8	1,3	0,54	
4/1	0	12	4,2	0,10		30/12		9	2,7	0,18	
4/1	0	12	4,2	2,40		31/12		10	4,9	0,07	
5/1	1	13	2,4	0,14		2/1		12	5,8	0	
6/1	2	14	7,1	0,18		4/1		14	10,0	0	
7/1	3	15	6,6	0,04		6/1		16	11,6	0	
8/1	4	16	8,2	0,04		8/1		18	11,4	0	
11/1	7	19	6,8	0		11/1		21	17,9	0	
13/1	9	21	1,7	0,12		13/1		2	14,5	0,20	
15/1	11		0	0,13		15/1		4	12,1	0,19	
18/1	14		0	0,11		18/1		7	0,9	0,21	
20/1	16		0	0,17		20/1		9	0,1	0,40	
22/1	18		0	0,29		22/1		11	0	0,43	
25/1	21		0	0,39		25/1		14	0	1,02	
27/1	23		0	0,43		27/1		16	0	2,07	

25	29/1	0	0,62	18	32	1,63
28	1/2	0	2,41	21	35	2,08
30	3/2	0	2,31	2	37	0,90
32	5/2	0	2,71	4	39	0,77
35	8/2	0	1,99	7	42	0,62
37	10/2	0	1,57	9	44	0,27
39	12/2	0	0,88	11	46	0,24
42	15/2	0	0,76	14	49	0,17
44	17/2	0	0,42	16	51	0,19
46	19/2	0	0,26	18	53	0,14
49	22/2	0	0,20	21	56	0,10
51	24/2	0	0,34	2	58	0,21
53	26/2	0	0,19	4	60	0,19
56	1/3	0	0,23	7	63	0,27
58	3/3	0,23	0,20	9	65	0,31
60	5/3	0	0,21	11	67	0,42
63	8/3	0	0,19	14	70	0,46
65	10/3	0	0,17	16	72	0,63
67	12/3	0	0,14	18	74	0,66
70	15/3	0	0,10	21	77	0,12
72	17/3	0	0,08	2	79	0,13
74	19/3	0	0,05	4	81	0,21
77	22/3	0	0,08	6	84	0,51
79	24/3	0	0,04	8	86	0,49
81	26/3	0	0,09	10	88	0,43
84	29/3	0	0,05	13	91	0,28
86	31/3	0	0,05	15	93	0,28
88	2/4	0	0	17	95	0,17
91	5/4	0	0	20	98	0,15
93	7/4	0	0		100	0,15
95	9/4	0	0		102	0,06
98	12/4	0	-		105	0
100	14/4	0	0		107	0
102	16/4	0	0		109	0

Figure 1

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

11/6	165	0
14/6	168	0
16/6	170	0
18/6	172	0
21/6	175	0,1
23/6	177	0,3
25/6	179	1,0
28/6	182	1,5
30/6	184	1,6
2/7	186	1,2
5/7	189	1,3
7/7	191	1,2

tableau 3

Date	VACHE 3 1398	
	jour cycle	[Pg] (ng/ml)
Témoin		
4/12	14	5,2
7/12	17	5,9
9/12	19	2,4
11/12	21	0
14/12	3	0
16/12	5	0,4
18/12	7	1,5
21/12	10	4,0
23/12	12	4,1
26/12	15	2,6
28/12	17	4,1
30/12	19	2,9
2/1	21	0
4/1	2	0
6/1	4	0,6
8/1	6	1,4
11/1	9	2,9
13/1	11	3,5
15/1	13	4,5
18/1	16	9,4
20/1	18	3,5
22/1	20	2,4
25/1	2	0
27/1	4	0
29/1	6	0,2
1/2	9	3,2
3/2	11	2,5
5/2	13	3,6
8/2	16	4,5
10/2	18	4,6
12/2	20	0,9
15/2	2	0
17/2	4	0
19/2	6	0
22/2	9	0
24/2	11	0
26/2	13	2,2

1/3	16	3,0
3/3	18	5,2
5/3	20	3,2
8/3	0	0
10/3	2	0
12/3	4	0,2
15/3	7	1,7
17/3	9	2,4
19/3	11	3,2
22/3	14	3,5
24/3	16	4,3
26/3	18	4,6
29/3	21	1,2
31/3	0	0
2/4	2	0
5/4	5	0
7/4	7	0,9
9/4	9	1,1
12/4	12	1,8
14/4	14	2,7
16/4	16	1,7
19/4	19	1,7
21/4	21	3,0
23/4	23	0,7
26/4	0	0
28/4	2	0,5
30/4	4	0,8
3/5	7	2,2
5/5	9	3,2
7/5	11	3,2
10/5	14	3,1
12/5	16	6,0
14/5	18	3,6
17/5	21	0,6
19/5	2	0,7
21/5	4	0,5
24/5	7	0,8

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

tableau 4

dose = 50mg DTrp6 / vache

VACHE 1 1393				VACHE 7 1901				VACHE 10 1923			
Date	nbr jour après inj.	jour cycle	[Pg] (ng/ml)	Date	nbr jour après inj.	jour cycle	[Pg] (ng/ml)	Date	nbr jour après inj.	jour cycle	[Pg] (ng/ml)
24/5		21	0	13/07/93			1,95	13/07/93			6,43
26/5		0	0	16/7			4,04	16/7			5,70
28/5		2	0	20/7		21	0	20/7		21	0
31/5		5	1,13	23/7		3	0	23/7		3	0
2/6				27/7				27/7			
4/6	2	9	3,08	30/7	3	10	3,68	30/7	3	10	4,69
7/6	5	12	4,38	3/8	7	14	6,43	3/8	7	14	7,58
9/6	7	14	8,63	6/8	10	17	10,85	6/8	10	17	13,3
11/6	9	16	8,43	10/8	14	21	0,30	10/8	14	21	16,9
14/6	12	19	4,60	13/8	17		0	13/8	17		12,7
16/6	14	21	1,05	17/8	21		0	17/8	21		0
18/6	16		0	20/8	24		0	20/8	24		0
21/6	19		0	24/8	28		0	24/8	28		0
23/6	21		0	27/8	31		0	27/8	31		0
25/6	23		0	31/08	34		0	31/08	35		0
28/6	26		0	3/9	38		0	3/9	38		0
30/6	28		0	7/9	41		0	7/9	42		0
2/7 ch	30		0	10/9	45		0	10/9	45		0
5/7 ch	32		0	13/9	48		0	13/9	48		0
7/7	35		0	17/9	52		0	17/9	52		0
9/7	37		0	21/9	56		0	21/9	56		0
13/7	41		0	24/9	59		0	24/9	59		0

16/7	44	0	28/9	63	0	28/9	63
20/7	48	0	1/10	66	0	1/10	66
23/7	51	0	5/10	70	0	5/10	70
27/7	55	0	8/10	73	0	8/10	73
30/7	58	0	12/10	77	0	12/10	77
3/8	62	0	15/10	80	0	15/10	80
6/8	65	0	19/10	84	0	19/10	84
10/8	69	0	22/10	87	0	22/10	87
13/8	72	0	26/10	91	0	26/10	91
17/8	76	0	29/10	94	0	29/10	94
20/8	79	0	2/11	98	0	2/11	98
24/8	83	0	5/11	101	0	5/11	101
27/08	86	0	9/11	105	0	9/11	105
31/08	90	0	12/11	108	0	12/11	108
3/09	93	0	16/11	112	16/11	16/11	112
7/09	97	0	19/11	115	19/11	19/11	115
10/09	100	0	23/11	119	23/11	23/11	119
14/09	104	0	26/11	122	26/11	26/11	122
17/09	107	0					
21/09	111	2					
24/09	114	5	0,40				
28/9	117	8	1,80				
1/10	120	11	3,50				
5/10	124	15	1,70				
8/10	127	18	2,10				
12/10	131		2,30				
15/10	134		1,80				
19/10	138		2,10				
22/10	141		2,20				

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

26/10	145	2,40
29/10	148	2,90
2/11	152	2,50
5/11	155	2,10
9/11	159	0
12/11	162	0,70
16/11	166	
19/11	169	
23/11	173	
26/11	176	

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

tableau 5

dose = 16.7mg DTrp6 / vache											
VACHE 3 1398				VACHE 4 1866				VACHE 5 1867			
Date	nbr jour après inj.	jour cycle	[Pg] (ng/ml)	Date	nbr jour après inj.	jour cycle	[Pg] (ng/ml)	Date	nbr jour après inj.	jour cycle	[Pg] (ng/ml)
17/5		21	0,63	10/5		21	6,80	4/6			0,75
19/5		2	0,73	12/5		0	0,80	7/6		0	0
21/5		4	0,48	14/5		2	0	9/6		2	0
24/5		7	0,77	17/5		5	0,60	11/6		4	0,31
28/5		11	1,55	19/5		9	1,40	14/6		8	1,98
28/5	2	11	1,02	21/5	2	9	1,60	16/6	2	9	3,02
31/5	5	14	1,76	24/5	5	12	6,00	18/6	4	11	4,65
2/6	7	16	2,03	26/5	7	14	9,00	21/6	7	14	5,41
4/6	9	18	3,08	28/5	9	16	8,50	23/6	9	16	11,15
7/6	12	21	4,93	31/5	12	19	7,10	25/6	11	18	7,23
9/6	14		3,59	2/6	14	21	9,40	28/6	14	21	4,12
11/6	16		5,22	4/6	16		8,45	30/6	16		4,83
14/6	19		4,51	7/6	19		7,64	2/7	18		0
16/6	21		6,62	9/6	21		4,29	5/7	21		0
18/6	23		5,66	11/6	23		4,96	7/7	23		0
21/6	26		5,35	14/6	26		6,29	9/7	25		0
23/6	28		5,70	16/6	28		7,59	13/7	29		0
25/6	30		7,96	18/6	30		5,12	16/7	32		0
28/6	33		4,05	21/6	33		5,97	20/7	36		0
30/6	35		1,00	23/6	35		7,05	23/7	39		0
2/7	37		6,00	25/6	37		6,47	27/7	43		0
5/7	40		3,50	28/6	40		7,24	30/7	46		0

7/7	42	5,56	30/6	42	7,06	3/8	50	0
9/7	44	3,32	2/7	44	3,55	6/8	53	0
13/7	48	5,31	5/7	47	5,10	10/8	57	0,83
16/7	51	5,12	7/7	49	7,50	13/8	60	2,70
20/7	55	4,65	9/7	51	7,70	17/8	64	4,04
23/7	58	4,96	13/7	55	7,76	20/8	67	5,40
27/7	62	4,35	16/7	58	6,42	24/8	71	0
30/7	65	3,88	20/7	62	7,12	27/08	74	0
3/8	69	3,01	23/7	65	4,94	31/08	78	1,79
6/8	72	3,42	27/7	69	4,71	3/09	81	3,00
10/8	76	4,24	30/7	72	6,46	7/09	85	5,50
13/8	79	5,80	3/8	76	5,04	10/09	88	5,80
17/8	83	4,00	6/8	79	5,50	14/09	92	5,90
20/8	86	6,34	10/8	83	7,95	17/09	95	0
24/8	90	6,28	13/8	86	7,10	21/09	99	0
27/08	93	5,64	17/8	90	7,90	24/09	102	2,30
31/08	97	4,25	20/8	93	8,10	28/9	106	5,10
3/09	100	9,80	24/8	97	8,10	1/10	109	5,10
7/09	104	0	27/08	100	7,10	5/10	113	3,80
10/09	107	0,50	31/08	104	5,70	8/10	116	0,70
14/09	111	3,60	3/09	107	7,00	12/10	120	0
17/09	114	3,10	7/09	111	7,20	15/10	123	1,60
21/09	118	2,90	10/09	114	4,50			
24/09	121	4,10	14/09	118	4,50			
28/9	124	0	17/09	121	5,90			
1/10	127	0	21/09	125	4,60			
5/10	131	1,80	24/09	128	5,00			
8/10	134	3,80	28/9	131	5,70			
12/10	138	4,50	1/10	134	5,00			

15/10	141	17	4,30	5/10	138	3,70
19/10	145	21	0	8/10	141	6,40
22/10	148	3	0	12/10	145	5,10
26/10	152	7	0,70	15/10	148	4,30
				19/10	152	6,20
				22/10	155	8,90
				26/10	159	6,10
				29/10	162	4,80
				2/11	166	3,80
				5/11	169	6,90
				9/11	173	5,60
				12/11	176	5,50
				16/11	180	
				19/11	183	
				23/11	187	
				26/11	190	

Tableau 6 :
Génisse 37 : premier traitement de superovulation

Jour de traitement GnRH	Traitement Stimufol	Chaleurs	Population folliculaire					
			Ovaire droit			Ovaire gauche		
			Nbre	Moy.	Ecart	Nbre	Moy.	Ecart
16	2 Inj. de 0,8 ml (M,S)	-	+ 13	9,2	9-12,6	+ 13	6,4	6,3-6,6
17	2 Inj. de 0,8 ml (M,S)	-	+ 13	11,3	11-11,6	+ 13	6,7	6,6-7
18	2 Inj. de 0,8 ml (M,S) 1 Inj. 3 ml de Pro. (M)	-	+ 13	8,5	5,6-15	+ 13	6,9	5,6-7,5
19	2 Inj. de 0,8 ml (M,S)	-	+ 13	10,3	7,6-16,6	+ 13	10,8	8,6-12
20	2 Inj. de 0,8 ml (M,S)	S	+ 13	12,4	9,6-15	+ 13	11,8	5,6-14
21	1 Inj. de 0,8 ml (M) 3000 hCG IV (S)	-	+ 13	16,7	11-21,3	+ 13	15,1	11-17,6
22	-	-	+ 13	15,9	13-21,3	+ 13	15,3	13-18,6
30	1 Inj. de 3 ml Pro. (M)	-	4 + 15 CJ	19,6	18-23	4 + 10 CJ	13,4	13-14,6
37	-	-	8	11	7-17,6	7	11,5	7,6-21

Nombre total d'injections de Stimufol : 11 (x 0,8 ml) soit environ 440 µg de pFSII, soit environ 40 µg de pFSII par injection.

Tableau 7 :
Génisse 37 : deuxième traitement de superovulation

Jour de traitement GnRH	Traitement Stimufol	Chaleurs	Population folliculaire					
			Ovaire droit			Ovaire gauche		
			Nbre	Moy.	Ecart	Nbre	Moy.	Ecart
43	-	-	8	6,5	5-11	+13	6	5-7,3
44	2 Inj. de 1 ml (M,S)	-	+13	6,4	5-11,3	+13	5,6	5-6
45	2 Inj. de 1 ml (M,S)	-	+10	6,7	6-11	10	6,3	5,3-6,3
46	2 Inj. de 1 ml (M,S) 1 Inj. 3 ml de Pro. (M)	-	+13	8,9	7-11,6	+13	9,2	7-15,6
47	2 Inj. de 1 ml (M,S)	M	+13	9,9	6,6-11,6	+13	10	7-11,6
48	2 Inj. de 1 ml (M,S)	-	+13	12,8	9,6-18,3	+13	13,3	10,6-15,3
49	1 Inj. de 1 ml (M,S) 3000 UI hCG IV (S)	S	+13	14,3	11-16,6	+13	14,5	13,3-15,3
50	1A (M, S)	-	+13	15,4	11,3-18,3	+13	15,3	13,6-17,6
56	collecte d'embryons : - 2 non fécondés, - 2 dégénérés (20-30 €)	-	8 ± 10 CJ	15,4	11,6-19,6	5 ± 10 CJ	12,8	11,3-14,6

Nombre total d'injections de Stimufol : 11 (x 1 ml) soit environ 550 µg de pFSII, soit environ 50 µg de pFSII par injection.

Tableau 8 :
Génisse 80 : premier traitement de superovulation

Jour de traitement GnRH	Traitement Stimufol	Chaleurs	Population folliculaire					
			Ovaire droit			Ovaire gauche		
			Nbre	Moy.	Ecart	Nbre	Moy.	Ecart
20	2 Inj. de 0,8 ml (M,S)	-	2	5	5-5	1	6	-
21	2 Inj. de 0,8 ml (M,S)	-	10	5,6	5,6-7	7	6	6-6
22	2 Inj. de 0,8 ml (M,S) 1 Inj. de 3 ml Pro. (M)	-	10	7,3	9,6-13	8	7,3	6-9
23	2 Inj. de 0,8 ml (M,S)	-	+13	9,5	7,3-12,3	+13	10,3	8,3-13
24	2 Inj. de 0,8 ml (M,S)	M	+13	12,4	11,3-13,3	+13	10,4	9-11,3
25	2 Inj. de 0,8 ml (M)	-	+13	12,7	9,6-15,3	+13	12,3	10,3-13,6
26	1 Inj. de 0,8 ml (M) 3000 UI d'hCG IV (S)	-	+13	15,6	13,6-21	+13	13,8	12,6-16,6
27	-	M	-	-	-	-	-	-
34	1 Inj. de 3 ml Pro	-	8 ± 3 CJ	17,9	13-23,6	4 ± 7 CJ	16,2	13,3-14
41	-	-	7	14,3	7,6-23,6	4	10,2	9,6-12,6

Nombre total d'injections de Stimufol : 13 (x 0,8) soit 520 µg de pFSH, soit 40 µg par injection.

Tableau 9 :
Génisse 80 : deuxième traitement de superovulation

Jour de traitement GnRH	Traitement Stimufol	Chaleurs	Population folliculaire					
			Ovaire droit			Ovaire gauche		
			Nbre	Moy.	Ecart	Nbre	Moy.	Ecart
47	-	-	4	18	14,6-19,3	4	6,7	5,6-10,3
48	2 Inj. de 1 ml (M,S)	-	9	9,9	5,6-18,3	6	6,2	5,3-9
49	2 Inj. de 1 ml (M,S)	-	+13	8,4	5-16	10	6,4	6-8
50	2 Inj. de 1 ml (M,S) 1 Inj. de 3 ml Pro. (M)	-	+13	10,1	6,6-14	10	7,3	6,3-7,6
51	2 Inj. de 1 ml (M,S)	M	+13	11	7,3-14,6	+13	9	7,6-10,4
52	2 Inj. de 1 ml (M,S)	-	+13	10,9	9-13,3	+13	11,2	9,6-13
53	2 Inj. de 1 ml (M,S)	-	+13	13,3	12-15,6	+13	12,9	11,6-15
54	3000 UI hCG IV (M) Tentative d'IA (S) -> hémorragie utérine	M	+13	13,7	11,6-14,3	+13	14,2	12,3-17,3
60	-	-	4 ±10 CJ	12,3	10-14	6 ±10 CJ	15,9	8-19,6

Nombre total d'injections de Stimufol : 12 (x 1 ml), soit 600 µg de pFSII, soit 50 µg de pFSII par injection.

Tableau 10

Apparition et durée des chaleurs lors des traitements de superovulation.

Animal	Quantité de Stimulol utilisée (mg)	Moment des chaleurs Nbre de jours après la 1ère Inj. de Stimulol	Une (ou 1/2) journée	Deux jours	Trois jours	Deux périodes de une journée (ou 1/2) espacées de 2 jours	Deux périodes de une journée (ou 1/2) espacées de 3 jours
87	112,5	5					X
27 (a)	50	5	X				
27 (b)	32	4			X		
99 (a)	50	4		X			
99 (b)	32	4				X	
37 (a)	44	5	X				
37 (b)	55	4				X	
80 (a)	52	5					X
80 (b)	60	4					X

a, b : premier et deuxième traitement de superovulation respectivement; Inj. : injection

Tableau 11

Nombre d'ovulations et d'embryons.

Génisses	Nombre de corps jaunes		Nombre de follicules restants		Embryons récoltés
	ovaire droit	ovaire gauche	ovaire droit	ovaire gauche	
37	plus de 15	plus de 10	4 follicules (moy. = 19,6)*	4 follicules (moy. = 13,4)*	-
80	3 environ	7 environ	8 follicules (moy. = 17,9)*	4 follicules (moy. = 16,2)*	-
37	10 environ	10 environ	8 follicules (moy. = 15,4)	6 follicules (moy. = 12,8)	- 2 ovocytes non fécondés - 2 embryons dégénérés (stage 20-30 f)
80	10 environ	10 environ	4 follicules (moy. = 12,3)	6 follicules (moy. = 15,9)	pas d'embryons récoltés : hé- morragie utérine à la 1ère LA

Observations effectuées une huitaine de jours après la fin du traitement de superovulation ou lors de la collecte d'embryons
* taille en mm

REVENDICATIONS

1 - Méthode de superovulation dirigée des femelles bovines, comprenant les étapes suivantes :

- 5 - administrer à l'animal un analogue de la LHRH de manière à désensibiliser l'hypophyse à l'action de la LHRH endogène,
- à l'instant de son choix à l'intérieur de la période d'anoestrus profond ainsi induite, administrer à l'animal de l'hormone FSH de manière à induire le recrutement et le
10 développement des follicules ovulatoires,
- en fin de développement, administrer à l'animal une hormone choisie parmi le groupe consistant en LH et hCG, de manière à déclencher l'ovulation de ces follicules.

15 2 - Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce l'on administre l'analogue de la LHRH au début de la phase lutéale.

3 - Méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la mise en anoestrus profond est réalisée par l'administration d'un analogue agoniste de LHRH
20 à dose supraphysiologique.

4 - Méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la mise en anoestrus profond est réalisée par l'administration d'un analogue antagoniste de LHRH.

25 5 - Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'on administre un analogue de LHRH présenté au sein d'une formulation permettant sa libération continue.

6 - Méthode selon la revendication 5, caractérisée
30 en ce que la formulation comprend des polymères dégradables.

7 - Méthode selon la revendication 6, caractérisée en ce que les polymères sont des poly (lactide-glycolide) ou des poly (lactique-glycolique).

8 - Méthode selon la revendication 7, caractérisée en ce que, comme formulation, on utilise des microsphères de

poly(lactide-glycolide) ou de poly(lactique-glycolique) de ratio allant de 50:50 à 65:35.

9 - Méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce que la formulation comprend des corps gras.

5 10 - Méthode selon la revendication 8, caractérisée en ce que les corps gras sont des acides gras ou des esters d'acide gras ou de polyéthylène-glycol.

10 11 - Méthode selon l'une quelconque des revendications 6 à 10, caractérisée en ce qu'on administre une formulation sous forme de films, implants ou microsphères.

15 12 - Méthode selon l'une quelconque des revendications 6 à 11, caractérisée en ce que l'on administre à l'animal une dose d'analogue agoniste comprise entre 15 et 150 mg pour une formulation de libération de 40 à 50 jours environ et entre 30 et 300 mg pour une formulation de libération de 85 à 100 jours environ.

20 13 - Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que l'on administre un analogue agoniste de la LHRH choisi parmi le groupe consistant en D.Trp⁶-LHRH et Des-Gly-D.Trp⁶-LHRH éthylamide.

25 14 - Méthode selon l'ensemble des revendications 12 et 13, caractérisée en ce que l'on administre une dose de D.Trp⁶-LHRH comprise entre 40 et 150 mg pour une formulation de libération de 40 à 50 jours et entre 100 et 300 mg pour une formulation de libération de 85 à 100 jours.

30 15 - Méthode selon l'ensemble des revendications 12 et 13, caractérisée en ce que l'on administre une dose de Des-Gly-D.Trp⁶-LHRH éthylamide supérieure à 15 mg pour une formulation de libération de 40 à 50 jours et supérieure à 30 mg pour une formulation de libération de 85 à 100 jours.

16 - Méthode selon la revendication 15, caractérisée en ce que les doses sont respectivement comprises entre 30 et 40 mg et entre 60 et 80 mg.

17 - Méthode selon l'une quelconque des

revendications 1 à 16, caractérisée en ce que, pour induire le recrutement et le développement des follicules ovulatoires, on administre de l'hormone FSH pendant de 4 à 7 jours.

5 18 - Méthode selon la revendication 17, caractérisée en ce que l'hormone FSH est administrée par voie parentérale à raison de deux administrations journalières.

10 19 - Méthode selon la revendication 17, caractérisée en ce que l'hormone FSH est administrée au sein d'une formulation permettant sa libération continue sur la période de 4 à 7 jours.

20 - Méthode selon l'une quelconque des revendications 17 à 18, caractérisée en ce que l'on associe de l'hormone LH à l'hormone FSH.

15 21 - Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisée en ce que, pour déclencher l'ovulation, on administre de l'hormone LH ou hCG le dernier jour du traitement à la FSH.

20 22 - Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 21, caractérisée en ce que, pour déclencher l'ovulation, on administre de l'hormone LH ou hCG lorsque les follicules ont atteint ou dépassé un diamètre de 14-15 mm environ.

25 23 Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 22, caractérisée en ce que, pour déclencher l'ovulation, on administre de l'hormone LH ou hCG pendant de 1 à 2 jours environ.

30 24 - Méthode de mise en anoestrus profond, dans laquelle on administre à l'animal un analogue de la LHRH, choisi dans le groupe consistant dans les agonistes et les antagonistes de la LHRH, en quantité suffisante pour désensibiliser l'hypophyse à l'action de l'hormone LHRH endogène.

25 - Méthode selon la revendication 24, caractérisée en ce qu'on administre à l'animal, au début de

sa phase lutéale, un analogue de la LHRH présenté dans une formulation permettant sa libération continue sur une durée appropriée à l'obtention de la durée choisie pour l'anoestrus profond.

5 26 - Méthode selon la revendication 25, caractérisée en ce que la formulation est à base de polymères choisis parmi le groupe consistant en poly(lactide-glycolide) et poly(lactique-glycolique).

10 27 - Méthode selon l'une quelconque des revendications 24 à 26, caractérisée en ce que l'analogue de la LHRH est choisi dans le groupe consistant en D.Trp⁶-LHRH et Des-Gly-D.Trp⁶-LHRH éthylamide.

15 28 - Kit de superovulation pour les femelles bovines, comprenant, séparément, une formulation à libération continue comprenant comme principe actif un analogue de la LHRH, une formulation comprenant comme principe actif de l'hormone FSH et une formulation comprenant un principe actif choisi dans le groupe consistant en hormone LH et hormone hCG.

20

25

30

vache n°1 (1393)

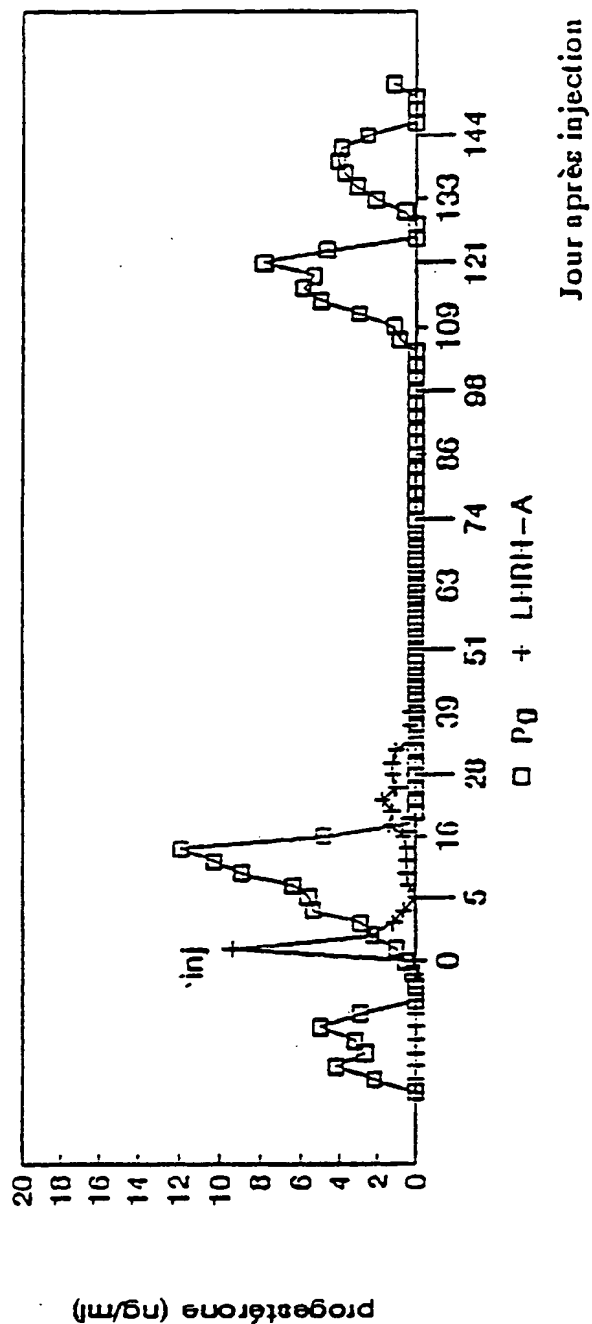


FIG.1

2/5

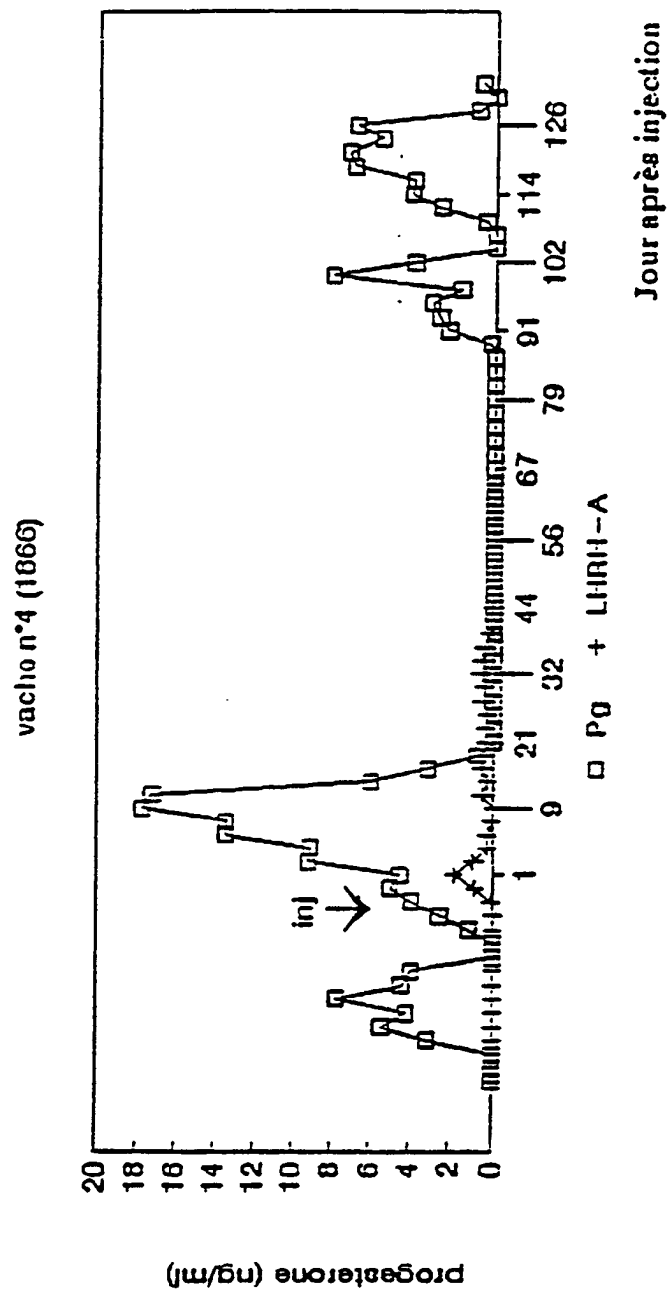


FIG. 2

3/5

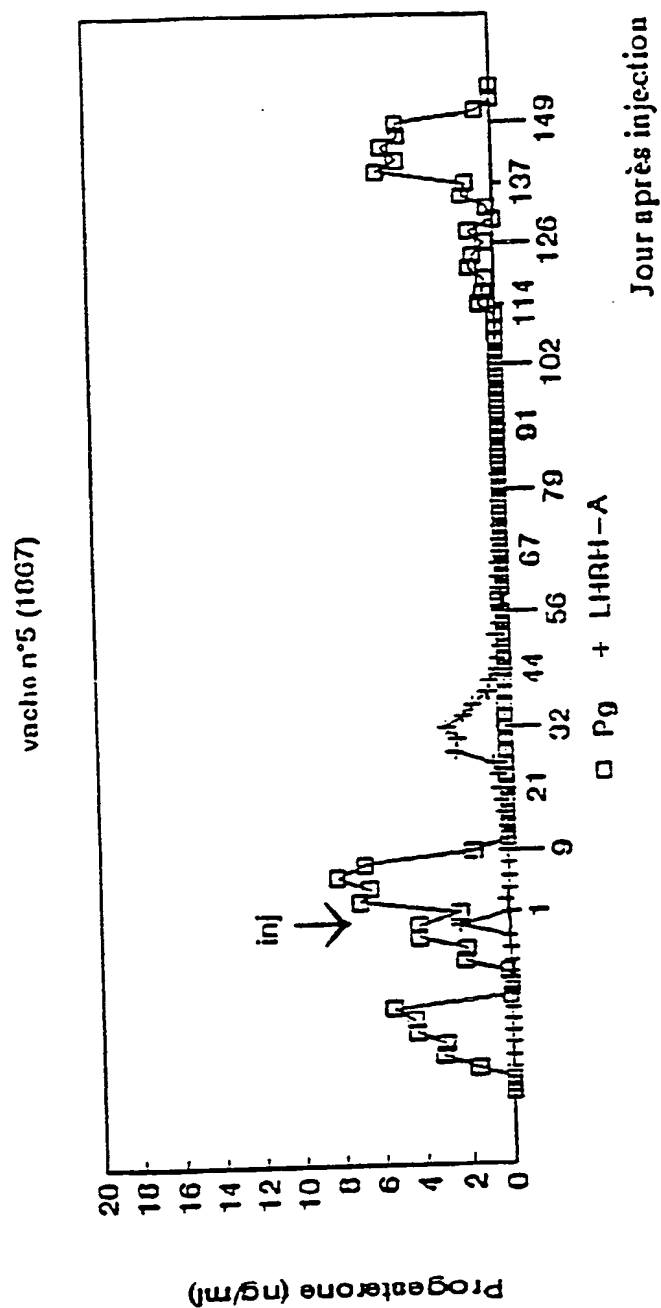


FIG. 3

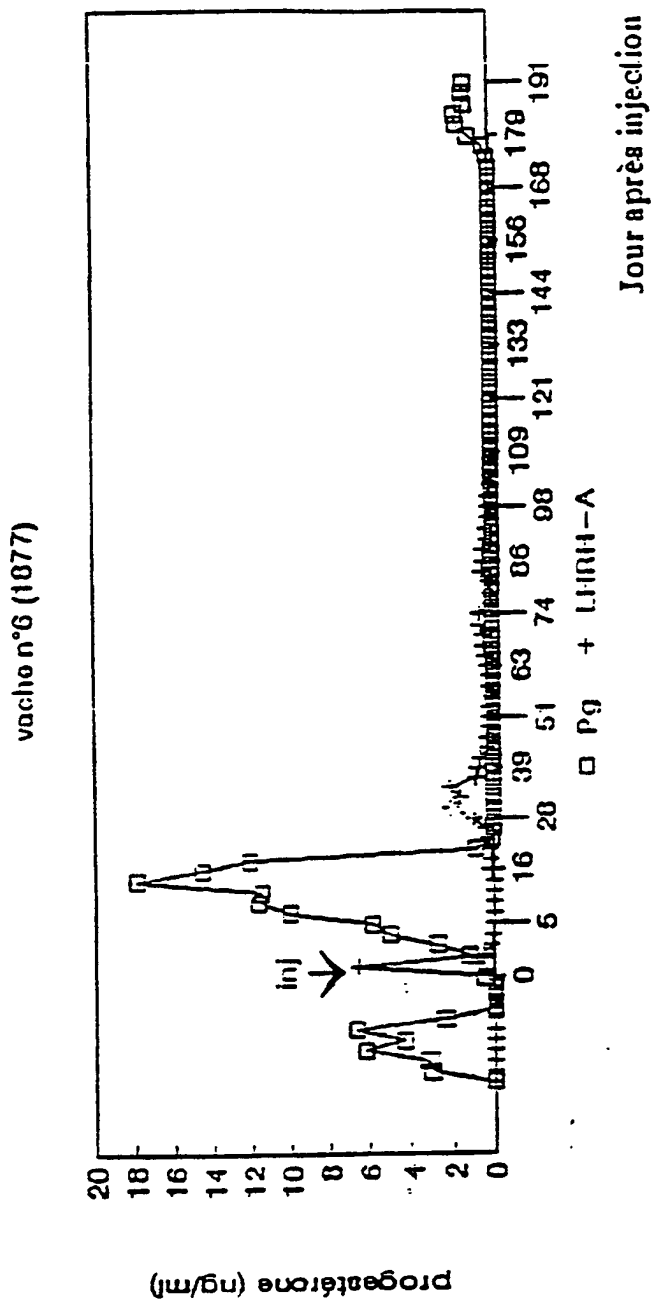
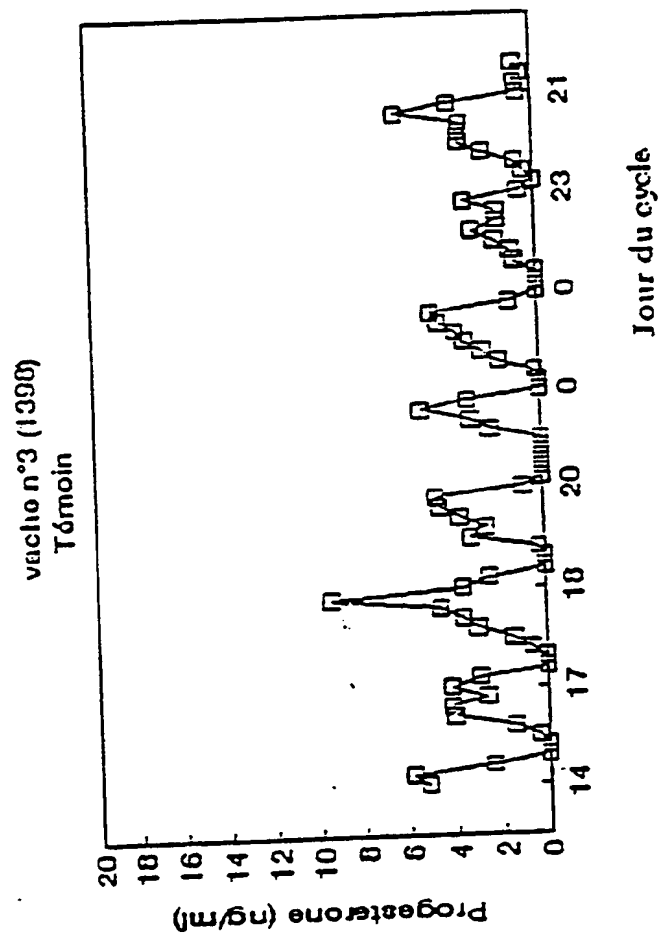


FIG. 4

5/5

FIG. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No.
PCT/FR 94/01464

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K38/24 //(A61K38/24,38:09)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF REPRODUCTION AND FERTILITY SUPPLEMENT, vol.45, 1992, OXFORD pages 5 - 19 MCNEILLY A.S. ET AL 'Luteinizing hormone pulses, follicle-stimulating hormone and control of follicle selection in sheep' cited in the application *page 9-page 11, ---	1-28
A	EP,A,0 161 063 (HODGEN,G.D.) 13 November 1985 see page 8, line 19 - page 9, line 16 ---	1-28
A	WO,A,90 14839 (NOVO NORDISK) 13 December 1990 see page 4, line 19 - page 5, line 18 ---	1-28
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- '&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 March 1995

Date of mailing of the international search report

3 0. 03. 95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Fernandez y Branas,F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 94/01464

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 566 135 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES) 20 October 1993 see page 13; examples 3-4 ----	1-28
A	EP,A,0 052 510 (SYNTEX (U.S.A.) INC.) 26 May 1982 see page 17 - page 18; example 1 ----	1-28
A	FR,A,2 313 940 (SCHALLY A.V.) 1977 cited in the application see the whole document ----	1-28
A	GB,A,2 001 077 (THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 1979 cited in the application see the whole document -----	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 94/01464

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0161063	13-11-85	JP-A- 61076421	18-04-86
		US-A- 4845077	04-07-89
WO-A-9014839	13-12-90	AU-B- 631660	03-12-92
		AU-A- 5814990	07-01-91
		EP-A- 0474787	18-03-92
		JP-T- 4505921	15-10-92
EP-A-0566135	20-10-93	JP-A- 6009424	18-01-94
EP-A-0052510	26-05-82	AU-B- 556754	20-11-86
		AU-A- 7756081	27-05-82
		CA-A- 1176565	23-10-84
		JP-B- 4040329	02-07-92
		JP-A- 57118512	23-07-82
		US-A- 4675189	23-06-87
FR-A-2313940	07-01-77	US-A- 4018726	19-04-77
		US-A- 4010125	01-03-77
		US-A- 4024121	17-05-77
		AU-B- 500087	10-05-79
		AU-A- 1452476	08-12-77
		BE-A- 842857	13-12-76
		CA-A- 1065859	06-11-79
		CA-A- 1067487	04-12-79
		CH-A- 615662	15-02-80
		DE-A, C 2625843	23-12-76
		GB-A- 1535602	13-12-78
		JP-C- 1380677	28-05-87
		JP-A- 52031073	09-03-77
		JP-B- 60022720	03-06-85
		SE-B- 427031	28-02-83
		SE-A- 7606692	13-12-76
		SE-B- 427032	28-02-83
		SE-B- 427037	28-02-83
		SE-B- 427033	28-02-83
		SE-B- 427035	28-02-83
		SE-B- 427034	28-02-83
		SE-B- 427039	28-02-83
		SE-B- 427038	28-02-83

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 94/01464

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2313940		SE-B- 427040	28-02-83
		SE-B- 427044	28-02-83
		SE-B- 427048	28-02-83
		SE-B- 427046	28-02-83
		SE-B- 427041	28-02-83
		SE-B- 427036	28-02-83
		SE-B- 427049	28-02-83
		SE-B- 427043	28-02-83
		SE-B- 427042	28-02-83
		SE-B- 427045	28-02-83

GB-A-2001077	24-01-79	US-A- 4218439	19-08-80
		AU-B- 519687	17-12-81
		AU-A- 3792978	17-01-80
		BE-A- 868970	03-11-78
		BE-A- 868971	03-11-78
		CA-A- 1110232	06-10-81
		CH-A- 639362	15-11-83
		DE-A- 2830629	22-02-79
		FR-A- 2397192	09-02-79
		NL-A- 7807612	16-01-79
		SE-A- 7807816	15-01-79

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

c Internationale No

PCT/FR 94/01464

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP,A,0 566 135 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES) 20 Octobre 1993 voir page 13; exemples 3-4 ---	1-28
A	EP,A,0 052 510 (SYNTEX (U.S.A.) INC.) 26 Mai 1982 voir page 17 - page 18; exemple 1 ---	1-28
A	FR,A,2 313 940 (SCHALLY A.V.) 1977 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-28
A	GB,A,2 001 077 (THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 1979 cité dans la demande voir le document en entier -----	1-28

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

Internationale No

PCT/FR 94/01464

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0161063	13-11-85	JP-A- 61076421	18-04-86
		US-A- 4845077	04-07-89
WO-A-9014839	13-12-90	AU-B- 631660	03-12-92
		AU-A- 5814990	07-01-91
		EP-A- 0474787	18-03-92
		JP-T- 4505921	15-10-92
EP-A-0566135	20-10-93	JP-A- 6009424	18-01-94
EP-A-0052510	26-05-82	AU-B- 556754	20-11-86
		AU-A- 7756081	27-05-82
		CA-A- 1176565	23-10-84
		JP-B- 4040329	02-07-92
		JP-A- 57118512	23-07-82
		US-A- 4675189	23-06-87
FR-A-2313940	07-01-77	US-A- 4018726	19-04-77
		US-A- 4010125	01-03-77
		US-A- 4024121	17-05-77
		AU-B- 500087	10-05-79
		AU-A- 1452476	08-12-77
		BE-A- 842857	13-12-76
		CA-A- 1065859	06-11-79
		CA-A- 1067487	04-12-79
		CH-A- 615662	15-02-80
		DE-A, C 2625843	23-12-76
		GB-A- 1535602	13-12-78
		JP-C- 1380677	28-05-87
		JP-A- 52031073	09-03-77
		JP-B- 60022720	03-06-85
		SE-B- 427031	28-02-83
		SE-A- 7606692	13-12-76
		SE-B- 427032	28-02-83
		SE-B- 427037	28-02-83
		SE-B- 427033	28-02-83
		SE-B- 427035	28-02-83
		SE-B- 427034	28-02-83
		SE-B- 427039	28-02-83
		SE-B- 427038	28-02-83

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

: Internationale No

PCT/FR 94/01464

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A-2313940		SE-B- 427040	28-02-83
		SE-B- 427044	28-02-83
		SE-B- 427048	28-02-83
		SE-B- 427046	28-02-83
		SE-B- 427041	28-02-83
		SE-B- 427036	28-02-83
		SE-B- 427049	28-02-83
		SE-B- 427043	28-02-83
		SE-B- 427042	28-02-83
		SE-B- 427045	28-02-83
GB-A-2001077	24-01-79	US-A- 4218439	19-08-80
		AU-B- 519687	17-12-81
		AU-A- 3792978	17-01-80
		BE-A- 868970	03-11-78
		BE-A- 868971	03-11-78
		CA-A- 1110232	06-10-81
		CH-A- 639362	15-11-83
		DE-A- 2830629	22-02-79
		FR-A- 2397192	09-02-79
		NL-A- 7807612	16-01-79
		SE-A- 7807816	15-01-79

THIS PAGE BLANK (USPTO)